



Л.А. ДЫКМАН В.А. БОГАТЫРЕВ
С.Ю. ЩЕГОЛЕВ Н.Г. ХЛЕБЦОВ

ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА,
БИОМЕДИЦИНСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ

НАУКА

L.A. DYKMAN V.A. BOGATYREV
S.Yu. SHCHYOGOLEV N.G. KHLEBTSOV

GOLD NANOPARTICLES

SYNTHESIS,
PROPERTIES,
BIOMEDICAL APPLICATIONS



MOSCOW NAUKA 2008

**Л.А. ДЫКМАН В.А. БОГАТЫРЕВ
С.Ю. ЩЕГОЛЕВ Н.Г. ХЛЕБЦОВ**

ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА,
БИОМЕДИЦИНСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ**



МОСКВА НАУКА 2008

Ответственный редактор
доктор биологических наук *В.В. Игнатов*

Рецензенты:
доктор физико-математических наук *В.И. Кленин*,
доктор физико-математических наук *В.В. Попов*

Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щёголев, Н.Г. Хлебцов ; [отв. ред. В.В. Игнатов] ; Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. — М. : Наука, 2008. — 319 с. — ISBN 978-5-02-035892-8.

Книга является первой отечественной монографией, в которой представлены современные данные о методах получения золотых наночастиц, их физико-химических свойствах и использовании в биомедицинских исследованиях. Рассмотрены методы синтеза золотых наночастиц различного размера, формы и структуры, их функционализации биомолекулами, а также методы оптического контроля всех стадий получения биомаркеров. Описаны современные оптические модели спектров поглощения и рассеяния золотых наночастиц и их конъюгатов с биомолекулами. Особое внимание уделено применению коллоидного золота в твердофазных методах анализа и в гомофазном иммуноанализе на частицах золя. Отдельный раздел посвящен использованию золотых наночастиц в качестве носителей антигенов при иммунизации.

Для специалистов в области нанобиотехнологии, биохимии, иммунохимии, аспирантов и студентов.

Темплан 2008-II-102

- ISBN 978-5-02-035892-8 © Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 2008
© Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щёголев С.Ю., Хлебцов Н.Г., 2008
© Редакционно-издательское оформление. Издательство «Наука», 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	7
Введение	10
1. Использование коллоидного золота в биомедицинских исследованиях (история и современность) ...	15
2. Методы получения золотых коллоидов	29
2.1. Физико-химические аспекты получения золотых гидрозолей	29
2.2. Обзор методик синтеза золотых наночастиц	34
2.3. Получение коллоидного золота с заданным размером частиц по методу Френса	39
2.4. Метод синтеза коллоидного золота со средним диаметром частиц 5 нм	43
2.5. Определение среднего диаметра золотых наночастиц .	44
2.6. Синтез золотых коллоидных частиц с участием высокомолекулярных восстановителей	48
2.7. Получение золотых несферических наночастиц	55
3. Оптические свойства металлических гидрозолей ..	69
3.1. Поверхностный плазмонный резонанс	70
3.1.1. Экспериментальное исследование поверхностного плазмонного резонанса золотых золей с частицами различных размеров	78
3.1.2. Оптические константы в зависимости от степени дисперсности золота	80
3.1.3. Расчет спектров ослабления золей	84
3.1.4. Зависимость положения и величины максимума ослабления от размера частиц коллоидного золота	87
3.2. Резонансное светорассеяние	94
3.3. Динамическое светорассеяние	116
4. Функционализация золотых наночастиц	121
4.1. Общие принципы конъюгации наночастиц с биомолекулами	121
4.2. Процедура получения конъюгатов коллоидного золота с биоспецифическими макромолекулами адсорбционным способом	127

4.3. Оптическая модель биоконъюгатов: теоретический анализ	133
4.4. Оптическая модель биоконъюгатов: сравнение теоретических и экспериментальных исследований	144
4.5. Хемосорбционный способ получения конъюгатов коллоидного золота с 5'-тиоолиготимидином	161
5. Применение коллоидного золота в микроскопии биологических объектов	172
5.1. Электронно-микроскопические исследования	172
5.2. Светомикроскопические исследования	177
5.3. Темнопольная визуализация наночастиц	179
6. Твердофазный иммуноанализ с использованием конъюгатов коллоидного золота	183
6.1. Обзор современных методик твердофазного иммуноанализа на мембранных носителях	183
6.1.1. Дот-блот анализ: принципы и применение	183
6.1.2. Коллоидное золото в твердофазных методах анализа	187
6.1.3. Методики проведения дот- и блот-анализов с применением конъюгатов коллоидного золота	192
6.1.4. Повышение чувствительности выявления результатов биоспецифических реакций в присутствии солей серебра	195
6.2. Использование методов дот-анализа для серотипирования микроорганизмов	196
6.3. Применение коллоидного золота в диагностике инфекционных заболеваний	199
7. Использование коллоидного золота для количественного определения белков	204
7.1. Оптимизация метода SPIA для количественного иммуноанализа	204
7.2. Метод определения концентрации белков с применением конъюгата трипсин-коллоидное золото	211
7.3. Развитие методов колебательной спектроскопии на основе конъюгатов золотых наночастиц с биологическими макромолекулами	214
8. Применение коллоидного золота для получения антител	228
8.1. Коллоидное золото как носитель антигенов для получения антител и производства вакцин	228
8.2. Адъювантные свойства золотых наночастиц	234
Заключение	256
Список литературы	259

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	— антиген,
АТ	— антитело,
БДАХ	— бензилдиметилгексадециламмонийхлорид,
БСА	— бычий сывороточный альбумин,
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека,
ГКР	— гигантское комбинационное рассеяние,
ДЛФО	— Дерягин-Ландау-Фервей-Овербек,
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота,
ДРС	— динамическое рассеяние света,
ДССР	— дифференциальная спектроскопия светорассеяния,
ЗХВК	— золотохлористоводородная кислота,
ИБФРМ	— Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов,
ИБХ	— Институт биоорганической химии,
ИК	— инфро-красный,
ИФА	— иммуноферментный анализ,
КЗ	— коллоидное золото,
КРС	— комбинационное рассеяние света,
КФ	— кислая фосфатаза,
ЛПС	— липополисахарид,

НСТ	— нитросиний тетразолий,
НЦ	— нитроцеллюлоза,
Олиго(Т)	— олиготимидин,
ОлН	— олигонуклеотид,
ОТ	— полимеразная цепная реакция с обратной транс- крипцией,
ПАВ	— поверхностно-активное вещество,
ПАФ	— полный адъювант Фрейнда,
ПВДФ	— поливинилдифторид,
поли(А)	— полиаденин,
поли(U)	— полиуридин,
ППР	— поверхностный плазмонный резонанс,
ПЭГ	— полиэтиленгликоль,
ПЭИ	— полиэтиленимин,
РА	— реакция агглютинации,
РНК	— рибонуклеиновая кислота,
РСР	— резонансное светорассеяние,
СПИД	— синдром приобретенного иммунодефицита,
СЭМ	— сканирующая электронная микроскопия,
ТЭМ	— трансмиссионная электронная микроскопия,
ФГА	— фитогемагглютинин,
ФИТЦ	— флуоросцеинизотиоционат,
ЦТАБ	— цетилтриметиламмонийбромид,
ЧСА	— человеческий сывороточный альбумин,

ЩФ	— щелочная фосфатаза,
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота,
ЭМ	— электронно-микроскопический,
HRTEM	— просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения,
IgG	— иммуноглобулин класса G,
SEIRA	— абсорбционная инфракрасная спектроскопия с усилением на поверхности,
SPIA	— иммуноанализ на поверхности частиц,
SPR	— поверхностный плазмонный резонанс,
T28	— олиготимидин длиной 28 нуклеотидов.

ВВЕДЕНИЕ

Характерной чертой современной науки является взаимное проникновение фундаментальных знаний и экспериментальных методик из одной отрасли в другую. Так, в иммунологии применяется целый ряд методов из других областей биологии: выделение антигенов и антител проводят с помощью биохимических методов фракционирования белков, гены иммунологически важных молекул секвенируют молекулярно-генетическими методами и т.п. В свою очередь, в иммунологии разработаны свои специальные методы исследования разнообразных химических соединений, основанные на взаимодействии антиген-антитело (АГ-АТ). Эти иммунологические подходы нашли широчайшее применение в различных областях биологии, медицины и аналитической химии [1, 2].

Высокоспецифичное и высокоаффинное взаимодействие АТ с АГ создает благоприятную препаративную и аналитическую основу для идентификации разнообразных биологических соединений, для изучения их физико-химических и биохимических свойств. Причем, какие бы новые методы иммуноанализа не разрабатывались, в них решающую роль играют АТ. Являясь уникальными молекулярными детекторами, АТ остаются базисом любого иммуноанализа, независимо от систем регистрации или применяемых реагентов. Однако известные технологии получения поли- и моноклональных АТ обладают рядом недостатков. К наиболее существенным из них следует, вероятно, отнести проблемы получения АТ к низкомолекулярным и низкоиммуногенным АГ, принципиальные ограничения применения моноклональных АТ в широком спектре традиционных методов иммуноанализа с использованием эффекта преципитации и т.д. В связи с этим особую актуальность приобретает развитие но-

вых иммунотехнологических методов получения АГ как *in vivo*, так и *in vitro*, позволяющих преодолеть в той или иной степени отмеченные выше ограничения.

Одним из важнейших компонентов современных иммунохимических тест-систем, используемым в качестве метки, являются наночастицы коллоидного золота (КЗ). Несмотря на то, что само КЗ имеет более чем тысячелетнюю историю, «революция в цитохимии», связанная с использованием частиц золота в биологических исследованиях, произошла в 1971 г., когда сотрудники факультета зоологии и биохимии университета Северного Уэльса В.П. Фолк и Г.М. Тейлор опубликовали статью «Имуноколлоидный метод для электронной микроскопии» [3]. В ней они описали способ конъюгации АГ с КЗ для прямой электронно-микроскопической визуализации поверхностных АГ сальмонелл.

За более чем 30 лет, прошедших с момента выхода этой статьи, предложено огромное количество вариантов использования иммунозолотого метода в биохимических, микробиологических, молекулярно-генетических и др. исследованиях. Причем, до последнего времени препараты КЗ использовались, в основном, в микроскопических методах анализа.

Однако в 2000 г. профессор Пенсильванского университета М. Натан открыл работу секции «Медицинская диагностика и химический анализ с использованием наносенсоров» в рамках крупнейшего мирового научного форума по биомедицинской оптике «BIOS-2000» докладом «Коллоидное золото в биологии: теперь не только для электронной микроскопии». В докладе констатировалось, что в последние годы расширились области применения металлических нанокластеров как датчиков биоаффинных взаимодействий в разнообразных биосенсорных системах. Большинство подобных систем основано на уникальных оптических свойствах наночастиц КЗ, в частности, на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР). При этом для регистрации изменений физико-химических свойств систем в процессе реакции АГ-АГ, когда один из ее компонентов адсорбирован на

частицах КЗ, используют визуальные наблюдения, а также методы светорассеяния, колебательной спектроскопии и др.

В последние годы наночастицы золота, серебра и их композиты широко используются как эффективные оптические детекторы биоспецифических взаимодействий. В частности, резонансные оптические свойства нанометровых металлических частиц успешно применяются для разработки так называемых биочипов и биосенсоров. Подобные устройства представляют большой интерес для биологии (определение содержания нуклеиновых кислот, белков и метаболитов), медицины (скрининг лекарственных веществ, анализ АГ и АГ, диагностика инфекций) и химии (экспресс-мониторинг окружающей среды, количественный анализ растворов и дисперсных систем). Особое значение имеет обнаружение определенных последовательностей нуклеиновых кислот (генов) и конструирование новых материалов, основанное на образовании трехмерных упорядоченных структур при гибридизации в растворах комплементарных олигонуклеотидов, ковалентно связанных с металлическими наночастицами [4, 5].

Помимо ДНК–ДНК и ДНК–РНК гибридизации (и взаимодействия АГ–АТ), в качестве биоспецифических взаимодействий в данной книге рассматриваются межмолекулярные взаимодействия типа фермент–субстрат, лектин–полисахарид, белок А–иммуноглобулин, авидин–биотин и т.п. Как детектирующий агент в данных реакциях используются наноразмерные металлические частицы — *метки* (главным образом, КЗ), входящие в состав *маркеров* — конъюгатов наночастиц с биоспецифическими макромолекулами — *зондами*. Кроме классического КЗ со сферическими частицами — наносферами — в качестве *носителей* биомолекул рассматриваются частицы коллоидного серебра и частицы несферической цилиндрической формы — наностержни, объединенные термином плазмонно-резонансные частицы.

О наличии реакции судят по изменению оптических свойств системы: поглощения или рассеяния света (статического или динамического). Спектры поглощения и рассеяния света КЗ в оптическом диапазоне хорошо описываются в рамках теории Ми [6], зависят от размера и формы частиц, диэлектрических па-

раметров (световой рефракции) их локального и интегрального окружения и расстояний между частицами. Данные динамического светорассеяния (ДРС) содержат параметры, обусловленные броуновским движением частиц (и супрамолекулярных комплексов — агрегатов) и зависящие от их размеров.

Таким образом, в данной работе биоспецифические взаимодействия на металлических наночастицах рассматриваются нами в рамках модели металлического ядра в биополимерной оболочке. В общем случае, взаимодействия между маркерами и мишенями могут приводить к двум принципиально различным сюжетам: а) образованию агрегатов частиц, имеющих псевдокристаллическую или аморфную структуру, или б) изменению только параметров полимерного слоя (плотности, толщины, коэффициента преломления или экстинкции). К сожалению, зачастую структурные перестройки указанных типов в системе могут приводить к сходным изменениям ее оптических характеристик. Тем не менее, совокупность данных полученных методами спектрофотометрии, спектронефелометрии и ДРС — позволяет охарактеризовать структуру образующихся комплексов и динамику их формирования. С учетом результатов независимых физико-химических методов исследования (твердофазного анализа, световой и электронной микроскопии), это позволяет судить о характере межмолекулярных биоспецифических взаимодействий.

Детектирование биоспецифических взаимодействий, основанное на изменении оптических свойств системы наночастиц-носителей, можно отнести к области сравнительно новой отрасли науки — биосенсорике. Причем, биосенсором является либо сама система в целом, либо отдельная частица-маркер (элементарный сенсор). В ряду оптических биосенсоров КЗ занимает особое место, поскольку может выступать и в роли метки в наносенсорном устройстве, и (см. ниже) как инструмент в молекулярно-биологических исследованиях, используемый *in vitro*, *in situ* и *in vivo*.

Большинство из рассматриваемых в данной монографии вопросов можно также отнести к сравнительно новой и бурно развивающейся области науки — нанотехнологии, точнее, биохи-

мии и биофизике наноразмерных структур. То, что классические объекты коллоидной химии ныне выделяют в отдельную область наноразмерных структур, четко обосновано в недавних обзорах В.И. Ролдугина [7] и М. Кортье [8]. Основным принципиальным отличием «нанотехнологического» описания высокодисперсных систем является определение свойств отдельных наноструктурных объектов и манипулирование отдельными наночастицами. В молекулярной биологии этот подход обозначает перспективу создания устройств, позволяющих распознавать отдельные молекулы.

1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОСТЬ)

Золото — один из первых открытых человеком металлов, и история его изучения насчитывает, как минимум, несколько тысяч лет. Первые сведения о КЗ можно найти в трактатах китайских, арабских и индийских ученых, которые уже в III-X веках синтезировали КЗ и использовали его, в частности, в лечебных целях. В средние века в Европе КЗ изучалось и применялось в лабораториях алхимиков и, возможно, удивительные цветовые превращения, сопровождающие конденсацию металлов при восстановлении из растворов солей, приводили к мысли о превращении элементов — трансмутации, а свойства панацеи приписывались КЗ [9]. Так Филипп Ауреол Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм (известный как Парацельс) писал о терапевтических свойствах “*quinta essentia auri*”, полученной им восстановлением хлорида золота спиртовыми растительными экстрактами. Врач французского короля Людовика XIII алхимик Давид де Плани-Кампи в 1583 г. рекомендовал для продления жизни свой “эликсир долголетия” — коллоидный раствор золота в воде. В трактате Кампи “Об истинном, непревзойденном, великом и универсальном лекарстве древних, или же о питьевом золоте, несравненной сокровищнице неисчерпаемых богатств” есть слова: “Золото есть вся природа, золото — семя земли”.

Первая из дошедших до нас книг, посвященных КЗ, была опубликована в 1618 г. философом и доктором медицины Франциском Антониом [10]. В ней содержались сведения о получении КЗ и его медицинском применении, включая практические советы. С середины XVII-го века стараниями И. Кункеля, Д. Гершеля, М. Фулхема, И. Рихтерса и др. КЗ начали использовать для производства красных (“рубиновых”) стекол, росписи фарфора (Кассиев пурпур), окраски шелка. Способ лечения алкоголизма

с помощью внутривенного вливания коллоидного раствора золота был предложен в 1880 г. американским врачом Л.Т. Келли. В 1927 г. КЗ было предложено использовать для облегчения страданий неоперабельных раковых больных [11].

Научное исследование проблем получения и использования КЗ началось в середине XIX-го века. К этому времени Томас Грэм и Франческо Сельми ввели в научную литературу термин “коллоидный раствор”, описали свойства подобных растворов и их отличия от растворов истинных. В 1857 г. вышла статья Майкла Фарадея [12], которая стала основополагающей научной работой, посвященной изучению способов синтеза и свойствам КЗ. В этой статье Фарадей впервые описал агрегацию КЗ в присутствии электролитов, защитный эффект желатины и других высокомолекулярных соединений, свойства тонких пленок высушенного КЗ. Приготовленные им растворы КЗ хранятся в Лондонском королевском институте до настоящего времени.

В конце XIX-го — начале XX-го века ряд работ (см., например, [13, 14]), посвященных изучению свойств КЗ, опубликовал Рихард Жигмонди. Им были впервые описаны способы синтеза КЗ с различными размерами частиц при использовании в качестве восстановителей перекиси водорода, формалина, белого фосфора, а также приведены важнейшие физико-химические (в том числе оптические) свойства золотых золей. КЗ было использовано им в качестве основного экспериментального объекта при создании (совместно с Г.Ф.В. Зидентопфом) ультрамикроскопа. В ходе этих исследований Жигмонди изучал динамику коллоидных систем. Зная, что частицы золота в коллоидном растворе заряжены отрицательно, он предположил, что возникающее в результате взаимное отталкивание между этими одинаково заряженными частицами служит причиной устойчивости золя. При добавлении в коллоидный раствор соли, образующие катионы отчасти нейтрализуют суммарный заряд поверхности частиц, что способствует их агрегации и, в конечном итоге, осаждению коллоидной суспензии. В сотрудничестве с физиком-теоретиком Марианом Смолуховским, Жигмонди рассчитал, на каком расстоянии друг от друга должны находиться в коллоидном растворе частицы золота, чтобы происходила их агрегация.

В 1925 г. Жигмонди была присуждена Нобелевская премия по химии “за установление гетерогенной природы коллоидных растворов и за разработанные в этой связи методы, имеющие фундаментальное значение в современной коллоидной химии”.

Классические работы по получению, анализу механизмов формирования КЗ и исследованию его седиментационных свойств (с помощью изобретенной им ультрацентрифуги) провел еще один Нобелевский лауреат — Теодор Сведберг [15]. В своих работах он, используя около двадцати пяти восстановителей, изучил кинетику восстановления и сформулировал основные представления о механизме формирования (химической конденсации) золотых коллоидных частиц.

В последующем вышел целый ряд работ, посвященных различным методикам синтеза золотых зольей, основанным как на дезинтеграции металлического золота электрической дугой, так и (в основном) на синтезе коллоидных частиц из галогенидов золота с использованием химических восстановителей или облучения. Из них наиболее важными нам представляются работы [16–20].

В дальнейшем КЗ использовалось (и продолжает использоваться) учеными как превосходный объект для изучения оптических свойств металлических частиц [6, 21–24] и фрактальных кластеров [25, 26], механизмов агрегации и стабилизации коллоидов [27–31], в аналитической химии [32, 33], в геомикробиологии и геобиохимии [34], фотографии [35]. Имобилизованное на поверхности электродов КЗ, используется для изучения каталитических процессов и электронного транспорта в биомакромолекулах [36]. КЗ, в отличие от кристаллического золота, обладает выраженной каталитической активностью [37, 38]. Изучалось также влияние КЗ на физиолого-биохимические процессы в бактериальных клетках [39].

Были предприняты попытки применения КЗ в медицине. КЗ в цветных реакциях на белки, содержащиеся в спинномозговой жидкости и сыворотке крови, использовалось с первой половины 20-го века [40, 41]. Предложенные в этих работах методы основаны на свойстве белков служить (в зависимости от их физико-химических свойств) либо флокулянтами, либо стаби-

лизаторами золотых коллоидов. Были разработаны способы лечения ревматоидного артрита с использованием растворов КЗ [42]. Коллоидные растворы изотопа золота ^{198}Au (период полураспада 65 ч) успешно использовались в терапевтических целях в онкологической практике [43] (об этом, в частности, упоминается в романе А.И. Солженицына "Раковый корпус"). В последнее время нерадиоактивное КЗ широко используют для диагностики и лечения раковых заболеваний. В частности, в работе Л. Тамаркина и соавторов [44] описывается использование коллоидно-золотого вектора для доставки фактора некроза опухоли (TNF) к солидным опухолям у мышей. При внутривенной инъекции, конъюгат КЗ-TNF быстро накапливается в клетках опухолей и не обнаруживается в клетках печени, селезенки и других здоровых органов животных. Накопление КЗ в опухоли доказывается регистрируемым изменением цвета опухоли, поскольку она приобретает яркий красно-фиолетовый цвет (характерный для КЗ и его агрегатов), что совпадает с максимумом опухоль-специфичной активности TNF. Вектор КЗ-TNF был менее токсичен и более эффективен в редуцировании опухоли, чем нативный TNF, так как максимальная антиопухолевая реакция достигалась при более низких дозах лекарства.

К. Питсиллидис с коллегами в 2003 г. описал новый метод для селективного повреждения клеток-мишеней, основанный на использовании золотых наночастиц, которые нагреваются короткими лазерными импульсами для создания локализованного повреждения клеток [45]. Метод тесно связан с фотодинамической лазерной терапией, но основан исключительно на светопоглощении, без потребности в фотохимических интермедиатах (в частности, синглетного кислорода). Уникальность частиц, в отличие от фотосенсибилизаторов, определяется тем, что они могут оставаться устойчивыми и инертными в клетках в течение продолжительного времени. Последующее облучение лазерными импульсами позволяет контролировать инактивацию клеток атравматичным способом. Механизм взаимодействия света с частицами был исследован с помощью микроскопии с наносекундным временным разрешением и тепловым моделированием. Диапазон свето-индуцированного повреждения был опре-

делен летальностью клеток, проницаемостью мембраны клеток и белковой денатурацией. Была выявлена сильная зависимость эффекта от размера частиц. Эта методика уже используется в дерматологии и офтальмологии, терапии рака [46, 47].

Еще одним, не менее интересным аспектом использования золотых наночастиц в медицине, представляется диагностика с их помощью онкологических заболеваний. Американские исследователи из технологического института Джорджии и университета Калифорнии под руководством профессора Мустафы Эль-Сайеда разработали новый метод простой и надежной диагностики и терапии онкологических заболеваний с помощью золотых наночастиц [48, 49]. Принцип диагностики основан на связывании конъюгатов специфических АТ и наночастиц золота с поверхностью раковых клеток. При этом наночастицы избегают здоровых клеток. Таким образом, можно “картографировать” опухоль с точностью до нескольких клеток. В работе [50] для диагностики и терапии рака предложено использовать золотые нанооболочки. В статье [51] обсуждаются антиангиогенные свойства золотых наночастиц.

Частицы золота применяются для изучения транспорта веществ в клетку путем эндоцитоза [52, 53], для доставки генетического материала в клеточное ядро методом баллистической трансфекции [54], для адресной доставки лекарственных веществ [55, 56]. Сведения о применении КЗ в различных областях науки и промышленности мы систематизировали в табл. 1.1.

Новая эра в использовании КЗ в биологии и медицине открылась, как отмечено выше, работой [3], в которой конъюгат КЗ с иммуноглобулинами впервые был применен в качестве иммунохимического маркера. В 1973 г. была опубликована работа Г. Френса [57], посвященная методам синтеза КЗ с определенным заранее заданным размером частиц. С этого момента началось активнейшее использование биоспецифических маркеров — конъюгатов КЗ в различных областях биологии. С тех пор вышло огромное количество работ, посвященных применению КЗ и его конъюгатов в исследованиях биохимиков, микробиологов, иммунологов, цитологов, физиологов растений, морфологов и др. специалистов. Кроме традиционной области применения —

Таблица 1.1

Применение коллоидного золота

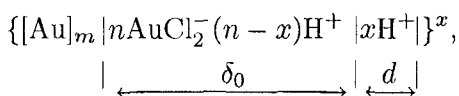
Отрасль	Варианты использования
Иммунохимия	Использование коллоидно-золотых маркеров в микроскопических и твердофазных методах иммуноанализа
Иммунология	Иммунизация животных с использованием частиц золота в качестве носителя; ДНК-вакцины
Биология клетки	Изучение транспорта веществ в клетку; трацерная техника
Генетика	Баллистическая трансфекция; гибридизация <i>in situ</i>
Геомикробиология, геобиохимия	Моделирование рудообразования микробными клетками
Медицина	Терапия опухолей, ревматоидного артрита и др. коллоидными растворами золота и его изотопов; диагностикумы; адресная доставка лекарств
Аналитическая биохимия	Качественный и количественный анализ биомолекул (SPIA, SPR, SERS, SEIRA)
Неорганическая химия	Аналитическая химия золота
Коллоидная химия	Изучение синтеза, агрегации и стабилизации коллоидных растворов
Оптика	Изучение рассеяния и поглощения света частицами и кластерами
Фотография	Фотопечать в растворах КЗ
Промышленность	Производство стекла, красителей

просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии (ТЭМ), КЗ стало широко использоваться в методах сканирующей электронной микроскопии, световой микроскопии, различных вариантах зондовой микроскопии, твердофазном анализе, анализе на частицах золя, проточной цитометрии, иммунодиффузии, иммунопреципитации, количественном анализе белков и др. Обширную информацию по важнейшим аспектам получения и использования КЗ-маркеров в биологии и медицине можно найти в книгах и обзорах [58–82].

Что же привлекло внимание исследователей в новом цитохимическом маркере? Прежде всего — его универсальность, т.е. возможность использования маркеров одного и того же типа в различных вариантах иммуноанализа. Кроме того, как явствует из работы [83], КЗ-методы в дот-блот анализе превосходят прочие (например, ИФА) по чувствительности (табл. 1.2), простоте, быстройдействию и дешевизне.

Уникальность золотых меток в ряду других определяется электрохимическими и оптическими свойствами КЗ. Прежде всего, гидрозолы золота — это типичные лиофобные коллоиды, устойчивые лишь в условиях низкой ионной силы. Отрицательный заряд поверхности частиц золота обеспечивает прочное адсорбционное взаимодействие их с высокомолекулярными соединениями, оказывающими на систему стабилизирующее воздействие за счет снижения поверхностной энергии частиц. Именно это электростатическое (не ковалентное) взаимодействие метки и зонда позволяет в наибольшей степени сохранить нативность биомакромолекулы, а, следовательно, активность и специфичность ее взаимодействия с биоспецифической парой.

Условно золотая мицелла может быть представлена следующим образом:



где $[\text{Au}]_m$ — ядро мицеллы (m — число от нескольких сотен до миллионов), δ_0 — адсорбционный слой, d — двойной электрический слой, а $n \ll m$. Ее схематическое изображение (согласно

Таблица 1.2

Пределы чувствительности иммунодот/блот-методов на нитроцеллюлозных фильтрах с использованием различных меток (согласно [84])

Метка	Предел чувствительности, пг белка/фракция
^{125}I	5
Пероксидаза хрена	10
Щелочная фосфатаза	1
Коллоидное золото	1
Коллоидное золото + серебро	0,1
Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ)	1000

[85]) представлено на рис. 1.1. Золотая коллоидная частица состоит по существу из кристаллического ядра (Au), на поверхности которого адсорбированы AuCl_2^- -ионы, которые составляют внутренний слой двойного ионного слоя. H^+ -ионы находятся в интермицеллярном растворе. На рис. 1.2. приведена электронная микрофотография золотой частицы, покрытой белком (из работы [86]).

Высокая электронная плотность, способность рассеивать и излучать вторичные электроны, характерное поглощение и рассеяние в видимой области светового спектра электромагнитных излучений, интенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяют легко обнаруживать золотые частицы с применением различных методик исследования (микроскопия, фотометрия, проточная цитометрия и др.) [59, 87–89]. Кроме того, возможность получения золей золота с различными раз-

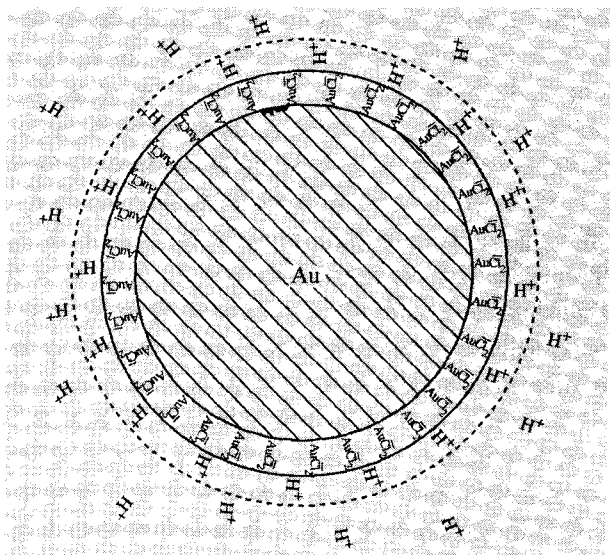


Рис. 1.1. Схематическое изображение золотой мицеллы

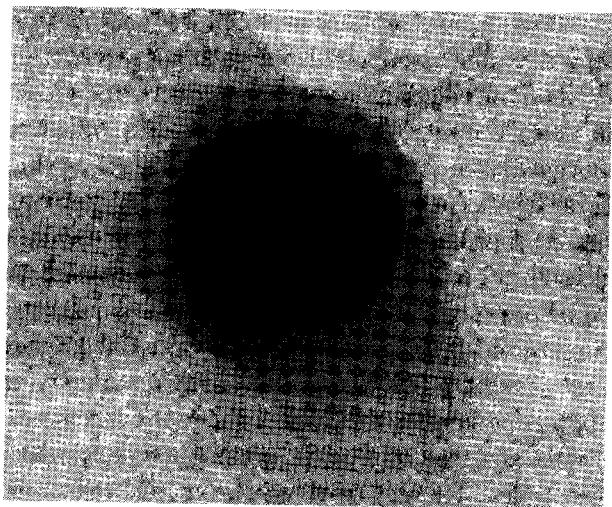


Рис. 1.2. Электронная микрофотография золотой частицы, покрытой белком

мерами частиц и их узким распределением обеспечивает высокое разрешение и позволяет проводить мечение одновременно по двум и более АГ (или иным лигандам). Наконец, размеры частиц КЗ после проведения соответствующей иммунохимической реакции можно увеличить с помощью реакции усиления солями серебра [90, 91] или золота (автометаллография) [92, 93], что существенно раздвигает границы применимости метода.

В последние годы расширилась область применения металлических наночастиц как эффективных оптических преобразователей результатов биоспецифических взаимодействий в детектируемый оптический сигнал в устройствах, называемых биочипами и биосенсорами [94]. Большинство подобных систем основаны на уникальных оптических свойствах КЗ, в частности, на явлении поверхностного плазмонного резонанса [95, 96]. Для регистрации изменений физико-химических параметров систем, происходящих в процессе биоспецифической реакции, когда один из участников реакции адсорбирован на частицах КЗ, используют визуальные наблюдения, а также методы светорассеяния, колебательной спектроскопии и др.

В настоящее время появляется много работ, описывающих биоспецифические взаимодействия на золотых частицах в таких системах, где наночастицы представлены в виде упорядоченных структур: самосборных (тонкие пленки) [97, 98] или в составе полимерных матриц [99]. Подобные структуры активно используются для детектирования биомолекул и микроорганизмов-возбудителей, для создания ДНК-чипов и др. В данном случае непосредственно реализуется принципиальная возможность использования резкого усиления оптического сигнала от маркера (золотой наночастицы, конъюгированной с биоспецифическими макромолекулами) из-за усиления возбуждающего локального поля в сформировавшемся агрегате из золотых нанокластеров.

Здесь нам хотелось бы чуть подробнее остановиться на понятии "нанотехнология". Этот термин в 1974 г. был впервые использован японским ученым Н. Танигучи на конференции Японского общества точного машиностроения [100]. Автор хотел привлечь внимание специалистов на грядущий переход к обработке материалов с ультравысокой точностью, прогнозируя, что к

2000 г. эта точность достигнет нанометрового интервала, что потребует применения как новых технологических приемов, так и соответствующего метрологического обеспечения.

Однако, принципиальное значение малоразмерных объектов было отмечено значительно раньше — в 1959 г. лауреатом Нобелевской премии физиком-теоретиком Ричардом Фейнманом. При обсуждении проблем миниатюризации в лекции “Внизу полным-полно места: приглашение в новый мир” (русский перевод — [101]) подчеркивалась актуальность работ в области сжатия информации, создания миниатюрных компьютеров, овладения молекулярной архитектурой. Фейнман затрагивал также проблемы смазки в малых узлах трения, обращал внимание на необходимость учета квантовых эффектов в небольших атомных ансамблях, указывал на важность понимания молекулярно-биологических явлений. Большие надежды он возлагал на химический синтез, отмечая при этом, что законы физики не запрещают конструирования объектов на атомно-молекулярном уровне.

В настоящее время приставка “нано” (одна миллиардная часть; 1 нанометр (нм) = 10^{-9} м) прочно вошла в современный научно-технический обиход, и метафоричность терминов “нанонаука”, “нанотехнология”, “наноматериалы” и др. уже не кажется странной. В фокусе этих направлений, родившихся на стыке физики, химии, материаловедения, биологии, электронной и компьютерной техники и получивших особенно интенсивное развитие в последние 10–15 лет, — так называемые наноразмерные объекты величиной приблизительно от долей нанометра до 100 нм. К объектам нанотехнологии относятся как индивидуальные частицы, пленки, стержни или трубки (т.е. трех-, двух- и одномерные образования, а также нульмерные объекты — квантовые точки), так и консолидированные наноструктурные и нанопористые материалы вместе с нанокompонентами и наноустройствами. Верхний предел указанного выше интервала размеров в значительной мере условен (на уровне сегодняшних знаний о предмете), а нижний определяется размерами атомов и молекул. Некоторые общие сведения о нанотехнологиях можно почерпнуть в книгах [102, 103].

Среди наноразмерных структур, фундаментальные исследования которых сейчас активно развиваются, большой интерес вызывают *кластеры* (от лат. *cluster* — гроздь) — образования, в которых число атомов варьирует от единиц до десятков и сотен тысяч. Кластеры занимают промежуточную область между отдельными атомами и твердыми телами и, соответственно, проявляют свойства, отличные от тех и других. Физические характеристики кластеров существенно зависят от вида входящих в них атомов и их числа. Причем ослабление такой зависимости (квантово-размерные эффекты) с ростом числа атомов свидетельствует о переходе материала из кластерного состояния в объемное. Среди кластеров простых веществ особое место занимают металлические кластеры (типичный пример — золотые наночастицы). Пристальное внимание к ним объясняется особенностями их электронной структуры, с одной стороны, а с другой — относительной простотой их получения для экспериментальных исследований.

Началом современного этапа развития физики металлических кластеров можно считать экспериментальное открытие у них в 1993 г. оболочечной электронной структуры, которая во многом напоминает оболочечную структуру атомов [104, 105]. Практически одновременно с первыми экспериментальными результатами существование электронных оболочек в многоатомных кластерах было описано теоретически. В основу теоретического подхода было положено свойство валентных электронов металла покидать свои атомы (делокализовываться) и образовывать зону проводимости. Оказалось, что именно эти обобществленные электроны ответственны за подобную энергетическую структуру кластера. Более того, их поведение определяет большинство необычных “коллективных” свойств кластеров [106, 107].

Делокализованные электроны в металлическом кластере определяют не только его структуру, но и характер поведения кластера в процессах взаимодействия с внешними полями. Так, в результате исследований процессов взаимодействия металлических кластеров с электромагнитным полем, которые интенсивно проводятся в последние годы, было обнаружено, что в

спектрах поглощения электромагнитной энергии наблюдаются гигантские максимумы — резонансы. Эти резонансы связаны с возбуждением коллективных колебаний электронной системы, аналогичных плазменным колебаниям электронного газа в плазме и макроскопических металлических телах. Такие колебания носят название плазмонных, а резонанс — *поверхностным плазмонным резонансом*. Причем амплитуда и частотный диапазон плазмонного резонанса в кластерах отличаются от таковых в макроскопических кристаллах. Если частицы формируют агрегаты, соответствующий плазмонный пик сдвигается в сторону длинных волн или уширяется в результате диполь-дипольного взаимодействия индуцированных светом дипольных моментов частиц в агрегате [108, 109]. Таким образом, оптические возбуждения в агрегате из металлических наночастиц имеют коллективную природу (делокализованы по многим мономерам). Поэтому полоса поглощения в области плазмонного резонанса электронов проводимости частиц изменяется специфическим образом. Локальные оптические поля, действующие на металлическую частицу во фрактальном агрегате, могут значительно превышать среднее поле, что приводит к гигантским нелинейным эффектам [110, 111]. Принципиально важно отметить, что на оптический отклик от наночастиц или их агрегатов (особенно упорядоченных) существенно влияют размер и форма частиц, межчастичное расстояние, а также свойства их локального диэлектрического окружения [112]. Это дает возможность управлять “настройкой” сенсоров.

Отмеченные выше свойства металлических нанокластеров послужили базой для создания новых многообещающих биосенсорных систем (SPR-биосенсоры), основанных на преобразовании эффектов биоспецифических взаимодействий в оптический сигнал. Теория создания и варианты практического использования подобных систем рассмотрены в обзорах [94, 113–128].

При создании биосенсорных устройств в настоящее время используются новые уникальные технологии, в частности, монослойная самосборка металлических частиц [129–132], нанолитография [133], вакуумное испарение [115] и др. Биосенсоры на основе золотых наночастиц применяются не только в иммуно-

анализе [134–136], но и для сверхчувствительной детекции нуклеотидных последовательностей [4, 137]. Недавно были получены [138, 139] рекордные показатели по чувствительности подобных сенсоров в цептомольном диапазоне и показана возможность детектирования спектров резонансного рассеяния от отдельных частиц. Это открывает путь к регистрации межмолекулярных взаимодействий на уровне отдельных молекул [140].

Кроме того, уникальные оптические свойства наночастиц серебра и золота, обусловленные локализованным поверхностным плазмонным резонансом, в настоящее время широко используются в различных технических приложениях. Таких как одноэлектронные транзисторы [141], оптическая микроскопия ближнего поля [142], усиленное поверхностное Рамановское рассеяние [143] (в том числе и на уровне отдельных молекул [144]), SPR-микроскопия и спектроскопия [120, 145, 146] и др. Современное состояние теории оптических свойств металлических наночастиц и их конъюгатов с биомакромолекулами рассмотрено в обзорах [147–155].

2. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЗОЛОТЫХ КОЛЛОИДОВ

2.1. Физико-химические аспекты получения золотых гидрозолей

Проблема получения изодисперсных металлических золей в медико-биологических исследованиях не сводится только к необходимости иметь красивый однозначный маркер для электронной микроскопии или набор таких маркеров для множественного мечения. По выражению О.А. Акципетрова, у наноструктурных объектов “электродинамические и молекулярно-адсорбционные явления удивительным образом переплетаются” [156]. Необычным в ультрадисперсных системах является уже то, что в ряду частиц одинакового состава различных размеров постоянным остается только соотношение их геометрических параметров. При постоянной массовой концентрации частиц их суммарная поверхность меняется обратно пропорционально эффективному линейному размеру частиц (т.е., линейно возрастает с ростом обратной величины этого размера). При этом поверхность и объем отдельной частицы убывают как квадрат и куб ее линейного размера, соответственно. Удельная поверхность частиц КЗ может достигать $150 \text{ м}^2/\text{г}$ [8].

Однако само понятие поверхности для частиц с размерами несколько единиц и десятков нанометров имеет специфические особенности. Это касается толщины и состава поверхностного слоя. Если у золотых частиц с диаметром 1–2 нм практически все атомы являются “поверхностными”, то с возрастанием диаметра до ~ 50 нм доля атомов, находящихся на границе раздела частица-дисперсионная среда, убывает до нескольких процентов. В связи с этим существенно изменяются и химические свой-

ства золотых наночастиц. Достаточно наглядно это иллюстрируется тем, что ультрадисперсные золотые частицы диаметром порядка 15 нм растворяются в горячей достаточно концентрированной (2,5 М) соляной кислоте в отсутствие нитрат-ионов с образованием хлорауратов [наши собственные наблюдения]. Следует отметить, что процесс растворения золота, серебра и других благородных металлов играет важную роль в образовании изодисперсных металлоколлоидов, поскольку начальные этапы формирования частиц конденсированной фазы носят обратимый характер.

Химия поверхностных явлений на металлических наночастицах напрямую связана с химией координационных соединений этих металлов. Особое положение золота, по мнению Кортье [8], заключается в исключительной способности противостоять окислению даже в ультрадисперсном состоянии. В связи с этим основное внимание в данной главе будет уделено именно золоту.

Следует отметить, что для нанометровых частиц физические постоянные отличаются от таковых компактного (конденсированного) металла и зависят от их размера. Так, температура плавления золота с частицами размером 5 нм ($\sim \text{Au}_{3600}$) составляет около 830°C , 2 нм ($\sim \text{Au}_{200}$) — 350°C , а 1 нм золото ($\sim \text{Au}_{30}$) должно плавиться при 200°C [8]. Не остается постоянной также их кристаллическая структура. По данным того же источника [8], среди наноразмерных кристаллов золота можно обнаружить усеченные октаэдры, икосаэдры, десятигранники Маркса и кубооктаэдры.

Особенно важным является то, что в ряду компактный металл — частица — кластер — атом благородного металла (Au, Ag, Cu) уменьшается стандартный окислительно-восстановительный потенциал $E^\circ (M^{n+}/M_{\text{bulk}})$. Восстановительные потенциалы еще более понижаются в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ) и нуклеофильных лигандов таких как I_2/SCN^- или I_2/I^- . При этом становится возможным растворение компактного металла без царской водки и даже в присутствии NaBH_4 [157].

До настоящего времени единственно полной монографией, посвященной химии золота, является фундаментальная работа

известного английского специалиста в области золотоорганических соединений Р. Паддефета [32] (недавно вышли три замечательных обзора [158–160], также посвященных химии золота). Как отмечает редактор русского перевода этой книги, общее количество синтезированных соединений золота по сравнению с другими металлами относительно невелико. И основную долю среди них составляют золотоорганические соединения, комплексы с фосфинами и кластерные соединения. При этом свойства соединений золота приводятся в сравнении с аналогичными соединениями металлов других групп, показывая аналогии и различия в реакционной способности, стереохимии, спектроскопических характеристиках и т.д.

В предисловии автора отмечается, что “В течение многих лет основное внимание химиков было сосредоточено на линейных двухкоординационных комплексах золота(I) и плоскоквадратных комплексах золота(III), однако в последнее время очень много работ посвящено изучению соединений золота(I) и золота(III) с более высокими координационными числами металла, и развита новая область — химия золота(II) и золота(V). Достигнут прогресс в понимании природы соединений со связями золото-металл”.

Золото — элемент с электронной конфигурацией $5d^{10}6s^1$, соответственно, оно принадлежит 11 (1b) группе периодической системы элементов. Для золота известен один стабильный изотоп ^{197}Au . Порядковый номер золота 97, атомная масса 196,967 [33]. Ниже приведены некоторые физические константы золота, взятые из того же источника.

Плотность при 18°C $19,31\text{ г/см}^3$; при 1063°C расплавленное — $17,3\text{ г/см}^3$; при 1063°C твердое — $18,2\text{ г/см}^3$.

Температура плавления $1063,4^\circ\text{C}$.

Кристаллическая структура — куб с центрированными гранями параметр a $4,070\text{ Å}$. Наименьшее расстояние между ядрами золота в кристалле составляет $2,884\text{ Å}$ [32].

Золото очень легко образует сплавы со многими элементами. Летучесть золота в сплавах, содержащих 95% Au, зависит от второго компонента и при 1100°C может колебаться от 0,012 (чистое золото) до 0,3–0,4% (в присутствии 5% Fe) [33]. Цвет

сплавов золота часто определяется другим металлом, входящим в сплав. Например, сплав, содержащий 50% меди, окрашен в темно-красный цвет, а сплав, в котором 65% серебра, окрашен в белый цвет и почти не отличим от чистого серебра. Белое золото, из которого обычно изготавливаются ювелирные изделия, содержит 75–85% золота, 8–10% никеля и 2–9% цинка; в состав более дорогих сплавов белого цвета входят палладий (90% Au, 10% Pd) или платина (60% Au, 40% Pt) [32].

Атом золота содержит 1s-электрон во внешней оболочке, следующая оболочка, содержащая 10d-электронов, неустойчива. Она может отдавать один, два или четыре электрона. Поэтому Au проявляет степень окисления +1, +2, +3 и +5.

Радиус атома Au равен 1,44 Å, условный радиус иона Au^+ — 1,37 Å, иона Au^{3+} — 0,85 Å; энергия ионизации $Au \rightarrow Au^+$ составляет 9,223 эВ, $Au \rightarrow Au^{3+}$ — 20,1 эВ; электроотрицательность Au(I) равна 2,3 [33].

Золото — наиболее благородный из всех металлов. Это — единственный металл, на который ни кислород, ни сера не действуют при любой температуре. В атомарном состоянии золото значительно более реакционноспособно, чем в компактном. В виде атомов золото существует в газовой фазе при высокой температуре в смеси с двухатомными молекулами. Энергия диссоциации молекул Au_2 (D_0°) составляет 221 ± 2 кДж/моль, а длина связи Au–Au равна 2,50 Å [32].

Золото обычно растворяется в водных растворах, содержащих лиганд, образующий с золотом прочные комплексы, и окислитель. Но каждый из этих реагентов, взятый в отдельности, не способен растворять золото. Так, например, золото не растворяется в заметной степени в соляной или азотной кислоте, но легко растворяется в царской водке с образованием золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) — $HAuCl_4$. Аналогичным образом золото растворяется в соляной кислоте в присутствии гипохлорит-ионов или железа(III), служащих окислителем.

Для золота характерна способность к комплексообразованию с кислородсодержащими лигандами, аммиаком и аминами, серосодержащими лигандами. Склонность к комплексообразованию золота обусловлена тем, что энергия образования соот-

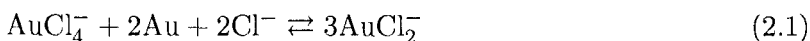
ветствующих ионов (сумма энергии сублимации и энергии ионизации) очень велика и имеется тенденция к образованию ковалентных связей с различными лигандами [161]. Для комплексов, содержащих только один атом золота, хорошо известны степени окисления I, II, III и V. Кроме того, золото образует большое число комплексов со связями металл-металл, в которых конкретному атому металла трудно приписать формальную степень окисления [32].

Из соединений золота наиболее часто встречаются такие, в которых оно проявляет степень окисления +1 и +3. Для Au(II) устойчив лишь сульфид, остальные соединения Au(II) разлагаются водой [33].

Для приготовления гидрозолей золота (а также в аналитической химии золота) из неорганических соединений наиболее часто используются простые и комплексные хлориды Au(I, III), особенно ионы AuCl_4^- .

AuCl обладает полимерной структурой с зигзагообразными цепочками из атомов золота и хлора, причем, каждый атом хлора служит мостиком между атомами золота. Таким образом, каждый атом золота имеет линейную координацию, характерную для золота(I). Связь в этом соединении носит преимущественно ковалентный характер, и структура AuCl совершенно отлична от структуры AgCl, кристаллизующегося в ионной решетке NaCl [32].

При нагревании холодного раствора AuCl на водяной бане в течение 12 часов появляется синее окрашивание вследствие диспропорционирования. В присутствии хлорид-ионов образуется растворимый комплекс AuCl_2^- . В 0,2-2 М HCl при 25°C константа равновесия реакции



равна $(1,8 \pm 0,3) \times 10^{-8}$ и $pK = 7,68$ [33].

Ион AuCl_4^- мало диссоциирует: $\beta_4 = 10^{-30}$. В широком интервале концентраций Au(III) в растворах HCl существует гидратированный ион $[\text{AuCl}_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ [33].

Изменение ионного состава комплекса в работе [162] иллюстрируют UV-Vis спектрами, отмечая, что при низких pH аб-

сорбционные полосы при 226 и 312 нм, соответствующие $p_\pi \rightarrow 5dx^2 - y^2$ и $p_\sigma \rightarrow 5dx^2 - y^2$ переходу металл-лиганд, однозначно указывают на присутствие квадратно планарного комплекса AuCl_4^- . При встраивании OH^- ионов во внутреннюю координационную сферу происходит сдвиг обеих полос в коротковолновую сторону. Интенсивность пика 312 нм уменьшается вплоть до исчезновения, что может быть результатом прогрессивного возрастания и уравнивания энергии p_π и p_σ орбиталей.

Данные по UV-Vis спектрам хлоридов золота весьма скудны. Отмечают, что спектры поглощения водных растворов AuCl_3 имеют сложную структуру, вызванную субколлоидными частицами [33]. Тем не менее известно, что раствор AuCl_4^- в 0,5 M NaCl имеет максимум светопоглощения при 311 нм; $\epsilon_{\text{max}} = 4,55 \times 10^4$. Растворы KAuCl_4 в 1 M HCl имеют 2 максимума светопоглощения: при $\lambda_1 = 226$ нм ($\epsilon = 3,16 \times 10^4$) и $\lambda_2 = 315$ нм ($\epsilon = 4,68 \times 10^3$); в 1 N KI $\lambda_1 = 288$ нм ($\epsilon = 3,89 \times 10^4$); $\lambda_2 = 355$ нм ($\epsilon = 3,16 \times 10^4$) [33].

Светопоглощением различаются также смешанные комплексы в растворах: для AuCl_3Br^- величина $\lambda_{\text{max}} = 314$ нм, $\epsilon = 5,8 \times 10^3$ нм; для AuClBr_3^- $\lambda_{\text{max}} = 349$, $\epsilon = 4,65 \times 10^3$ [33]. Очевидно, что полосы переноса заряда с лиганда на металл смещаются в сторону более низкой энергии при варьировании лиганда в ряду $\text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$, поскольку этот ряд отражает возрастающую легкость окисления галогенид-иона [32].

2.2. Обзор методик синтеза золотых наночастиц

Методы синтеза КЗ (и других металлических коллоидов) можно условно разделить на две большие группы в зависимости от способа их получения. К первой группе относятся дисперсионные методы, основанные на диспергировании металлов. Ко второй — конденсационные методы, когда наночастицы восстановленного металла образуются из ионов соответствующих солей. Первый из способов приготовления КЗ основан на разрушении металлического золота под действием электрического

тока высокого напряжения. Если в жидкости между двумя золотыми электродами под действием электрического тока образуется дуга, то из нее исходят облака раздробленного металла. Применение постоянного тока приводит к получению золей, неоднородных по величине частиц золота. Прибавление очень малых количеств щелочей или хлоридов, а также применение для распыления переменного тока высокой частоты существенно улучшает качество гидрозолей золота. Второй — более распространенный метод — основывается на синтезе коллоидных частиц из галогенидов золота (например ЗХВК) с использованием химических восстановителей и/или облучения (ультразвук, ультрафиолет, пульсационный или лазерный радиолиз) [163, 164].

В качестве восстановителей, применимых для синтеза золотых золей, известны около ста различных органических и неорганических соединений [33]. В пионерских работах Фарадея и Жигмонди [12, 13] в качестве восстановителей были предложены, в частности, формальдегид, этиловый спирт и белый фосфор. Эти вещества по сей день с успехом используются для получения золей со средним диаметром частиц 5–12 нм [165, 166]. В начале XX-го века для получения КЗ использовали практически не употребляемые в настоящее время восстановители: щавелевую и винную кислоты, оксид углерода, хлорид олова, гидразин, цитарин, перекись водорода, сахара, фенолы, ароматические альдегиды, эфирные масла и многие другие вещества (вплоть до водного экстракта голландских сигар) [165]. В 1951 г. для синтеза золей золота в качестве восстановителя был предложен цитрат натрия [167] (для получения КЗ со средним диаметром частиц 20 нм), в 1958 г. — аскорбиновая кислота [168] (12 нм), в 1963 — этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) [17] (20 нм). С 1982 г. для получения частиц диаметром около 5 нм активно используют борогидрид натрия [169], борогидрид вместе с цитратом натрия [170], цианоборогидрид [171]. Для получения частиц такого же размера был предложен метод, основанный на совместном использовании в качестве восстановителей цитрата натрия и танина [172, 173]. С целью получения ультрадисперсных золей (диаметр частиц 2–3 нм) использовали тиоцианат натрия или калия [174].

Все перечисленные выше методы получения КЗ химическим восстановлением основаны на реакции конденсации из пересыщенного раствора ЗХВК. Жигмонди и Сведберг [14, 15] изучили кинетику процесса восстановления и сформулировали основные представления о механизме формирования частиц золота на примере восстановления ЗХВК перекисью водорода:



В результате данной реакции образуется только один электролит, следовательно, за ее ходом можно наблюдать кондуктометрически.

В интерпретации Жигмонди и Сведберга, кинетика изменения электропроводности отражает следующие процессы (рис. 2.1). Вначале происходит восстановление около 30% ЗХВК. При этом образуется высокопересыщенный раствор золота (пересыщенность порядка 6 степени), что соответствует отрезку АВ на кинетической кривой электропроводности. Затем восстановление резко замедляется, и происходит конденсация золота с образованием очень мелких частиц (зародышей новой фазы) — отрезок БВ.

Такие частицы могут образовывать крупные, но нестабильные агрегаты (коагуляция с последующей пептизацией). Раствор золя при этом приобретает синюю окраску. Частицы, входящие в агрегаты, постепенно укрупняются и (по мере разрушения данных агрегатов) становятся центрами дальнейшего быстрого восстановления. При достижении зародышами определенного критического размера образуется устойчивый золь, имеющий красную окраску. Этот процесс соответствует отрезку ВГ на кинетической кривой рис. 2.1.

Исходя из конденсационного механизма формирования коллоидной фазы, можно выделить ряд управляющих параметров, определяющих степень дисперсности золотых суспензий закономерным и, в принципе, воспроизводимым образом. Очевидно, что скорость образования зародышей новой фазы зависит от степени пересыщенности раствора, то есть, главным образом, от концентрации реагирующих веществ и химической природы восстановителя. При низкой скорости возникновения зародышей и

достаточно высокой скорости конденсации частиц (низкая степень пересыщения) образуется относительно малое количество сравнительно крупных частиц. При более высокой скорости возникновения зародышей и сравнительно малой скорости конденсации частиц (высокая степень пересыщения) увеличивается вероятность образования большего количества частиц относительно малого размера. Однако увеличение концентрации восстановителя лимитируется агрегативной устойчивостью коллоидного золота, достаточно высокие показатели которой достижимы лишь в средах с низкой ионной силой.

Если идет самопроизвольное образование зародышей, то, чем больше зародышевых центров образовалось, тем более тонкодисперсными становятся золи. При этом в большинстве случаев быстрое образование зародышей и их рост происходят одновременно (т.е., растворенный металл расходуется сразу на оба процесса). Замедление скорости образования зародышей приводит к более грубодисперсному гидрозоллю, а замедление скорости роста частиц — к более тонкодисперсному. Однако исследования многочисленных препаратов КЗ, полученных с помощью химического восстановления, показали, что большинство из них имеет ограниченную стабильность и широкое распределение по размерам частиц [175].

Существует вариант этого метода (предложенный Жигмонди), когда в реакционную среду вносятся уже синтезированные (например, борогидридным методом) зародыши, которые ста-

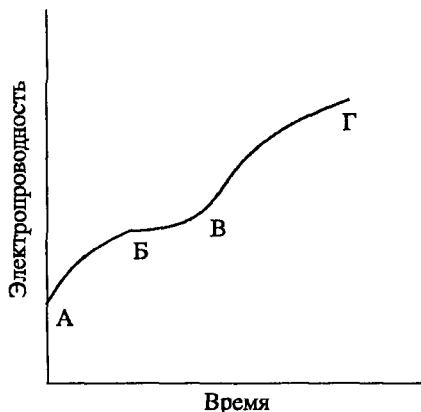


Рис. 2.1. Схематическое изображение кинетической кривой восстановления ЗХВК перекисью водорода в соответствии с [14]. Пояснения в тексте

новятся центрами конденсации. При этом восстанавливающими агентами могут служить цитрат натрия или гидроксиламин [176–178]. По данным авторов указанных работ, получающиеся при этом крупные частицы имеют гораздо более узкое распределение по размерам. Основное требование к условиям протекания реакции, обеспечивающее получение изодисперсных и изоморфных золей, — предотвращение образования новых зародышей. Как правило, это достигается постепенным увеличением концентрации золота в среде, содержащей зрелые частицы металлозоля [179].

Еще один вариант конденсационного метода предложен в работе [162]. Суть его заключается в восстановлении концентрированного раствора ЗХВК ($0,5 \text{ М/мл}^3$) изоскорбиновой кислотой в присутствии защитного коллоида — гуммиарабика. В этих условиях кроме конденсационного реализуется агрегационный механизм восстановления, в результате чего образуется практически монодисперсная система сферических частиц с диаметром от 80 нм до 5 мкм в зависимости от кислотности среды и концентрации восстановителя.

Кроме того, для получения золотых наночастиц используют, так называемый, двухфазный (микроэмульсионный) метод. На первой стадии металлсодержащие реагенты переводят из водной фазы в органическую, к которой затем добавляют растворы поверхностно активных веществ (ПАВ) и восстановителя. Было обнаружено, что при этом процессе образуются практически монодисперсные золи [180]. Позже был разработан однофазный метод, согласно которому в металлсодержащий органический раствор одновременно добавляли ПАВ и восстановитель [181]. Часто при этих способах синтеза в раствор добавляют алкантиолы, которые образуют на поверхности золота плотные самоорганизованные монослои [182–185]. Некоторые лиганды, такие как алкантиолы, амины, силаны, фосфины, галоиды и простые алканы, способны участвовать в расщепительном (дигестивном) созревании (digestive ripening) — процессе, в котором коллоидная суспензия при кипячении в растворителе с поверхностно-активными лигандами трансформируется из очень полидисперсной системы в практически монодисперсную [186].

Гораздо менее популярны, чем химические, физические методы восстановления, основанные на использовании ультразвука, ультрафиолетового, инфракрасного или ионизирующих излучений, лазерного фотолиза [17, 18, 187–193], и электрохимические методы [194]. К достоинствам этих методов следует отнести отсутствие в образующихся золях (собственно на поверхности металлических частиц) примесных остатков химических соединений [195].

В ЭМ исследованиях получили распространение в качестве метки кластеры золота, состоящие из 11–67 атомов (undecagold, “NanogoldTM”), диаметром 0,82–1,4 нм. Их получают восстановлением триарилфосфинового комплекса золота борогидридом натрия [20, 196–198] или восстановлением ЗХВК в метаноле в присутствии глутатиона [199, 200].

Новым направлением в нанобиотехнологии становится использование для синтеза КЗ клеток растений, микроорганизмов и даже человека [201–204].

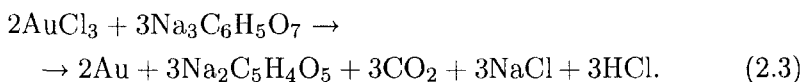
2.3. Получение коллоидного золота с заданным размером частиц по методу Френса

Наиболее широко распространенным методом получения золотых частиц с размерами в пределах 8–120 нм для медико-биологических приложений остается метод цитратного восстановления ЗХВК. Биологи при этом ссылаются на статью Френса [57], а материаловеды чаще упоминают работу Туркевича [167], посвященную изучению процессов нуклеации и роста при синтезе КЗ. Несмотря на более чем полувековую историю изучения и применения цитратного восстановления ЗХВК, химизм реакции и процесс формирования и развития золотых частиц продолжает интересовать исследователей [205, 206].

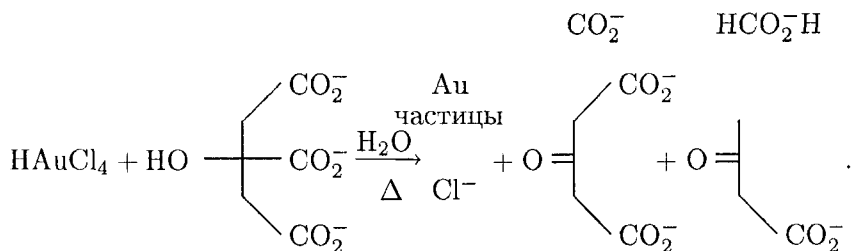
Суть метода Френса заключается в том, что к кипящему 0,01% водному раствору ЗХВК добавляют 1% водный раствор цитрата натрия в количестве, варьируемом в зависимости от требуемого размера частиц. Именно подбор концентраций для получения частиц с заранее заданными размерами отличает

этот метод от аналогов, использующих в качестве восстановителя цитрат натрия (см., например, [167]). В ряде случаев применяют модификацию этого метода, предложенную в работе [129], для получения КЗ с эквивалентной оптической плотностью $A_{520} \approx 2,5$.

Схема реакции цитратного восстановления может быть представлена следующим образом:



В работе [207] автор предполагает несколько иную схему окисления цитрат- и дикарбоксилат-ионов:



Следует заметить, однако, что все, обозначенные на схеме, продукты реакции (кроме, естественно, углекислого газа) являются восстановителями хлорауратов. По крайней мере, для муравьиной кислоты в реакции с золотом(III) определены термодинамические и кинетические параметры (энергия активации 29,3 ккал/моль), а для дикарбоновой щавелевой кислоты эти параметры имеют сильную зависимость как от температуры, так и от pH раствора. Для взаимодействия с HC_2O_4^- константа реакции $k_{20^\circ} = 0,23 \times 10^{-3} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$, энергия активации 13,7 ккал/моль; для взаимодействия с $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ $k_{20^\circ} = 2,0 \times 10^{-2} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ энергия активации 33,7 ккал/моль [33].

Исходя из стехиометрических соотношений, определенных уравнением (2.3), 2 моля Au(III) реагируют с 3 молями Na_3Cit . Действительно, при таком соотношении образуются золи с диаметром частиц 35–40 нм в диаметре. Однако, восстановление металла оказывается полным даже в тех случаях, когда выпол-

няется соотношение $[Au]/[Cit] > 1$. О чем свидетельствует то, что после формирования золя (~ 15 мин) прибавление новых порций восстановителя не приводит к заметным оптическим изменениям.

В отличие от эмпирически подобранных концентраций восстановителя, предложенных Френсом, нами была получена калибровочная кривая для расчета необходимого количества цитрата натрия при синтезе золотых частиц требуемого размера (рис. 2.2) [208]. Уравнение соответствующей аппроксимационной кривой имеет вид:

$$d(\text{нм}) = 38,2V^{-0,855}, \quad (2.4)$$

где V — объем (мл) 1% -ного раствора цитрата натрия в расчете на 100 мл золя, d — средний диаметр частиц КЗ.

Достаточно подробно влияние концентрации на конечный размер частиц исследовано в работе [209]. При соотношении $[Au]/[Cit] < 0,66$ образуются наиболее изодисперсные золи с частицами диаметром менее 40 нм (вплоть до 8–10 нм), что, по-видимому, является пределом для данной методики.

Мы использовали этот метод для получения золей золота с диаметром частиц в диапазоне 15–60 нм.

Золи золота со средним диаметром частиц 8–10 нм получали, используя модификацию метода, предложенную в работе [61], и отличающуюся порядком внесения реактивов (сначала цитрат натрия, а затем ЗХВК).

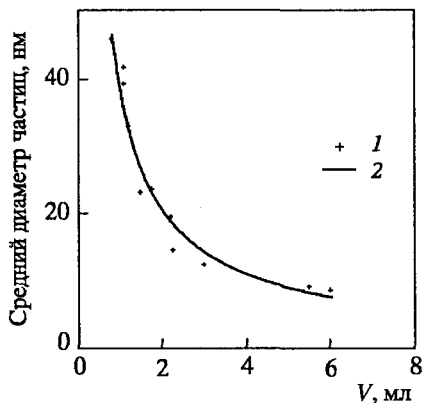


Рис. 2.2. Калибровочная кривая (2) для определения объема 1% цитрата натрия (на 100 мл золя), необходимого для получения частиц золота заданного размера, полученная по экспериментальным данным (1)

Ниже приведены протоколы получения золей золота со средним диаметром частиц 20 и 10 нм:

А. Для получения золей золота со средним диаметром частиц 20 нм:

в колбу Эрленмейера наливали точно 241,9 мл деионизованной воды;

воду доводили до кипения с обратным водяным холодильником на магнитной мешалке с электроподогревом;

добавляли 2,5 мл 1% раствора ЗХВК;

увеличивали обороты мешалки;

добавляли 5,5 мл 1% раствора цитрата натрия;

продолжали кипячение еще 30 минут;

наблюдали образование золя ярко красного цвета.

Б. Для получения золей золота со средним диаметром частиц 10 нм:

в колбу Эрленмейера наливали точно 232,5 мл деионизованной воды;

воду доводили до кипения с обратным водяным холодильником на магнитной мешалке с электроподогревом;

добавляли 15 мл 1% раствора цитрата натрия;

увеличивали обороты мешалки;

добавляли 2,5 мл 1% раствора ЗХВК;

продолжали кипячение еще 15 минут;

наблюдали образование золя красного цвета.

Для получения золей золота со средним диаметром частиц 15, 25, 30, 40, 50, 60 нм при тех же условиях использовали, соответственно, 7,75, 4,25, 3,5, 2,75, 2,2, 1,7 мл 1% (38,8 мМ) раствора цитрата натрия. Концентрация золота во всех гидрозолях была постоянной и равной 57 мкг/мл ($2,85 \times 10^{-4}$ М).

Во всех процедурах получения КЗ (как, впрочем, и других ультрадисперсных материалов) большое значение уделяется чистоте посуды, реактивов и растворителей (воды). В своих экспериментах мы используем свежеприготовленную тридистиллированную воду, получаемую в стеклянном (пирекс) перегонном устройстве, очищенную от органических примесей активированным углем на этапе дистиллят-бидистиллят.

Для мытья стеклянной посуды использовали только моющие жидкости, не содержащие металлов типа хрома или марганца. Чаще всего это была царская водка (3 части HCl / 1 часть HNO_3), и при необходимости удаления органики — спирто-щелочные и спирто-солянокислые растворы.

Стандартно препараты получали добавлением необходимого количества стокового водного раствора цитрата натрия к определенному объему рабочего раствора ЗХВК, предварительно нагретому до кипения на магнитной мешалке с тефлонпокрытым пропеллером в колбе, снабженной обратным водяным холодильником. Несомненно, важную роль имеют скорость вращения ротора мешалки (некоторые авторы ее указывают), размеры и форма пропеллера, мощность нагревательной плитки и др. Но поскольку экспериментальная проверка всех факторов не представляется возможной, приходится руководствоваться принципом целесообразности.

Свежеприготовленные растворы еще горячими разливали в стерильные стеклянные флаконы с плотно закрывающимися крышками и хранили при комнатной температуре. Спектральные измерения проводили на следующий день.

2.4. Метод синтеза коллоидного золота со средним диаметром частиц 5 нм

Получение практически монодисперсных золей в диапазоне d порядка 3–5 нм оставалось сложной задачей, которая не была решена ни в одном из известных нам способов синтеза КЗ, в которых в качестве восстановителей использовались белый фосфор, таннин или борогидрид натрия [61].

Недостатком способа с использованием белого фосфора является его высокая токсичность и способность к самовоспламенению, что делает этот метод практически недоступным в условиях обычной неспециализированной лаборатории. Танниновый метод мало применим из-за ухудшения качества маркера, получаемого с этим КЗ, вследствие адсорбции на коллоидных частичках золота танниновой кислоты и высокомолекулярных продуктов ее окисления. Это приводит к экспериментальным

осложнениям на этапе конъюгации биоспецифического зонда с КЗ. Недостатками борогидридного способа являются невысокая степень воспроизводимости размеров золотых наночастиц и низкая стабильность золей при хранении.

Поэтому нами был предложен признанный изобретением способ [210], сущность которого заключается в восстановлении ЗХВК одновременно натриевой солью ЭДТА и борогидридом натрия при комнатной температуре и интенсивном перемешивании.

Протокол для получения золей золота со средним диаметром частиц 5 нм:

в колбу Эрленмейера наливали 45 мл холодного (4°С) водного раствора ЭДТА- Na_2 с концентрацией 0,0003 М;

начинали перемешивание без нагрева;

добавляли 0,2 мл 0,2 М раствора карбоната калия (реакция проходит в щелочных условиях);

добавляли 0,5 мл 1% раствора ЗХВК;

увеличивали обороты мешалки;

вносили очень быстро 125 мкл 0,5% холодного раствора борогидрида натрия;

наблюдали образование золя оранжево-красного цвета.

Полученные таким образом золи отличались высокой стабильностью и по данным ТЭМ были практически монодисперсны.

2.5. Определение среднего диаметра золотых наночастиц

Контроль качества золотых золей требует, прежде всего, оперативного определения среднего размера частиц. Традиционно для этого используют метод *электронной микроскопии* [61]. В наших исследованиях препараты КЗ наносили на гексагональные никелевые сеточки 200 меш (Balzers, Лихтенштейн), покрытые парлудиевой пленкой, укрепленной углеродом и предварительно гидрофилизированные 0,01% водным раствором поли-L-лизина (мол. масса 36000). Микроскопический анализ проводили на приборе "Tesla BS-500" (ЧССР) при ускоряющем напря-

жении 80 кВ. Полученные микрофотографии обрабатывали по обычной процедуре, измеряя наибольший и наименьший размер частиц, определяя, таким образом, средний радиус сферы эквивалентного объема и среднее осевое соотношение. Для каждого образца КЗ обрабатывали не менее 300 изображений частиц. В специальных экспериментах оценивали функции распределения частиц по размерам и факторам формы (осевому соотношению). Значения дисперсии σ варьировали от 0,1 до 0,2, причем для золей с меньшими размерами частиц полидисперсность была выше. Точность оценки распределений по факторам формы была невелика, в особенности для малых частиц. В первом приближении мы аппроксимировали разброс по отношениям осей равномерным распределением с определенной верхней границей.

Однако ЭМ метод препаративно весьма сложен. Поэтому мы решили использовать *спектрофотометрический метод*, основанный на известной зависимости максимума поглощения света металлическими золями от размера частиц [6, 21, 22, 211]. Спектры ослабления золей снимали на спектрофотометре "Specord M40" (Carl Zeiss Jena, Германия) в диапазоне длин волн 350–800 нм при толщине слоя 10 мм.

В работе [208] мы предложили калибровочную кривую, основанную на наилучшей сглаженной полиномиальной аппроксимации спектрофотометрических и ЭМ данных, для определения размера сферических золотых частиц с диаметром 5–50 нм, полученных цитратным методом Френса. Надежность этой калибровки была подтверждена другими авторами в независимых экспериментах [212–214].

На рис. 2.3 мы приводим новую калибровочную кривую (наши экспериментальные данные из работы [208] и экспериментальные данные других авторов [176, 177, 215–217]) в диапазоне диаметров частиц 3,5–100 нм. Эта калибровка описывается уравнением

$$d(\text{nm}) = \begin{cases} 2,02X - 23,1, & X = \lambda_{\max}(\text{nm}) - 500 \geq 20, \\ 20,8 - 4,1X \times \\ \quad \times (1 - 0,067X + 9,6 \times 10^{-4}X^2), & X < 20 \end{cases} \quad (2.5)$$

и может использоваться в гораздо более широком (до 100 нм) диапазоне, чем прежняя калибровка работы [208] (до 50 нм).

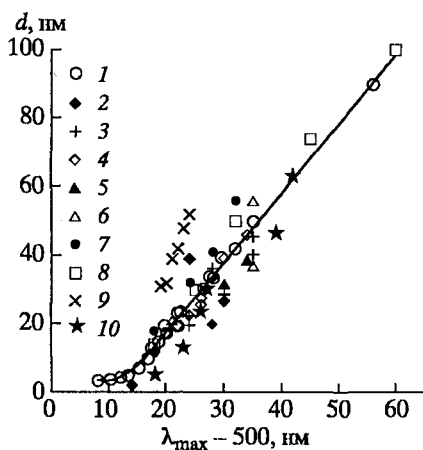


Рис. 2.3. Калибровочная кривая для определения среднего диаметра сферических частиц КЗ по положению максимума плазмонного резонанса. Значками обозначены экспериментальные данные, взятые из работ [208] (1), [177] (2–5), [176] (6, 7), [215] (8), [216] (9), [217] (10). Ссылки на оригинальные работы по данным (2–7) см. в [176, 177]

кой (2.5). Для наиболее “популярных” размеров частиц данные о количестве восстановителя и максимуме поглощения образующихся золей представлены в табл. 2.1.

Кроме того, для определения среднего размера и оценки полидисперсности золотых наночастиц нами был предложен метод спектроскопии дифференциального статического рассеяния света с использованием модифицированной флуорометрической приставки к спектрофотометру “Specord M40” [218]. Можно констатировать, что данный метод, по крайней мере, не уступает методу спектроскопии поглощения в определении размера частиц и превосходит его в оценке полидисперсности.

Следует иметь в виду, что форма частиц с диаметром более 40 нм, полученных цитратным методом Френса, обычно заметно отличается от сферической. Тем не менее, данные работы [215] (цитратный синтез) вполне описываются калибровкой (2.5), которая в определенной мере эффективно учитывает эффекты формы. Отметим также, что по непонятным пока причинам данные работы [216] (восстановление ЗХВК изоаскорбиновой кислотой) явно выпадают из общего массива экспериментальных точек и не описываются калибров-

Таблица 2.1

Количества цитрата Na и λ_{\max} для золей с различными размерами частиц

Средний диаметр частиц	λ_{\max}	Кол-во цитрата Na (мл/100 мл золя)
5	513	–
10	516	6
15	519	3,1
20	522	2,2
25	524	1,7
30	526	1,4
40	536	1,1

Еще одним методом, применяемым для определения размеров частиц, является метод *динамического рассеяния света* (ДРС) [219, 220].

Этот метод также слабо воздействует на исследуемый образец, работает в широком диапазоне размеров частиц и, в принципе, позволяет восстанавливать распределение золотых частиц по размерам [205]. Для измерения размеров частиц методом ДРС мы использовали описанную в работе [221] установку, работающую в режиме записи аналогового сигнала. Измерения показали хорошее согласие результатов ДРС с данными спектроскопии поглощения и рассеяния. Более подробно теория и практика оптического мониторинга размеров и формы частиц будет представлена в 4 главе.

Реже для характеристики частиц и конъюгатов используют дифференциальное центрифугирование, сканирующую и атом-

но-силовую микроскопию, малоугловое рентгеновское рассеяние, масс-спектрометрию, рентгеновскую дифракцию и др. методы [164, 222, 223].

2.6. Синтез золотых коллоидных частиц с участием высокомолекулярных восстановителей

Традиционные методы получения КЗ-маркеров заключаются в синтезе (восстановлением хлорауратов низкомолекулярными веществами) золотых наночастиц с последующей адсорбцией на них биополимеров.

Гораздо реже используют методы синтеза КЗ в присутствие синтетических или природных полимеров — полиэтиленгликоля (ПЭГ), поливинилпирролидона, поливинилацетата, полиамидо-амина (дендримера), полидитиафульвена, хитозана и др. [224–228]. Отмечается, что частицы, сформированные таким образом, отличаются большей однородностью размеров и формы [229, 230]. При этом в качестве восстановителей используют борогидрид натрия [231], спирты и эфиры [232], гидразин [233], дифениламинсульфонат натрия [234], ультрафиолетовое излучение [235]. В работе [236] предложен метод синтеза маркера на лектины с использованием модифицированного сахарами и тиогруппами ПЭГ. Восстановление борогидридом натрия авторы проводили в присутствии полимера, который ковалентно присоединялся к золотым частицам [237]. В работе [238] был предложен метод синтеза золотых наночастиц с использованием восстанавливающих свойств аминокислоты тирозина в составе функционального пептида. Спрос на частицы, равномерно распределенные в полимерных матрицах, и частицы, состоящие из металлического ядра и диэлектрической оболочки, возрос в связи с их использованием в биосенсорных устройствах [239–241].

В работе [242] авторы впервые предложили использовать высокомолекулярное вещество *одновременно* в качестве восстановителя и стабилизатора. При этом получаемые частицы золота оказывались покрытыми защитным слоем полимера (аминодекстрана). Как было отмечено авторами, это способствовало более длительному хранению золотых золей. Затем биоспеци-

фические макромолекулы (Ig) "пришивали" к покрытым аминодекстраном частицам золота с помощью бифункциональных реагентов (в частности, глутарового альдегида). Интересно отметить, что, по наблюдениям авторов, в ходе восстановления ЗХВК аминоекстранами реакционная смесь сначала приобретала бледно-розовую окраску, которая затем становилась ярко-красной (т.е. не наблюдалось посинение раствора, соответствующее обратимой агрегации мелких частиц). Следовательно, в единственной из известных нам работ, в которой использовался высокомолекулярный восстановитель — аминоекстран, механизм формирования золя золота, по-видимому, отличался от описанного в разделе 2.1.

Мы решили использовать подход, предложенный авторами [242], для одностадийного получения конъюгата КЗ с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Целью синтеза этого конъюгата было создание катионного маркера — аналога поли-L-лизина, который в качестве зонда впервые был использован в работе [243] и применялся в электронной микроскопии для маркирования отрицательно заряженных участков плазмалеммы. Однако следует отметить, что данный препарат, на наш взгляд, сложен в приготовлении и недостаточно устойчив при хранении.

Для приготовления маркера в колбу наливали 32,5 мл деионизованной воды, а затем добавляли 330 мкл 1% водного раствора ЗХВК и 70 мкл 10% водного раствора ПЭГ (Sigma, США). Смесь нагревали на магнитной мешалке с электроподогревом до кипения. При этом желтая окраска смеси при нагреве плавно переходила сначала в бледно-розовую, а затем в ярко-красную.

Мы впервые провели сравнительное спектрофотометрическое изучение кинетики образования зольей золота при восстановлении ЗХВК двумя различными по химической структуре соединениями: цитратом натрия и ПЭГ. Регистрацию спектров начинали с момента достижения температуры смеси 90°C и проводили через равные временные интервалы (1 мин). Первый из этих реагентов используется в ряде "классических" методов синтеза КЗ и их модификациях. Относительно второго до наших работ не имелось фактических данных о его использовании в подобном качестве.

Опыты проводили непосредственно в кювете спектрофотометра "Specord M40", используя приставку для термостатирования проб. При этом были зарегистрированы существенные различия в скоростях реакции восстановления (относительно быстрого для цитрата натрия и значительно более медленного для ПЭИ) и в спектральных характеристиках формирующихся суспензий (рис. 2.4).

В обоих случаях начальные этапы реакций характеризуются снижением оптической плотности на коротковолновом участке спектра (в характерной точке спектра поглощения при $\lambda = 320$ нм), что обусловлено уменьшением концентрации золота, находящегося в ионной форме. При этом поглощение в области спектра 500–550 нм, характерное для золей золота, оказывается незначительным. Затем, однако, кинетика процессов восстановления ЗХВК в рассматриваемых случаях значительно отличается. При использовании цитрата натрия наблюдается резкое нарастание оптической плотности в длинноволновой области с постепенным смещением максимума полосы поглощения от 700 до 520 нм. В случае же с ПЭИ возникновение дополнительной полосы поглощения не наблюдается, а отмечается плавный рост оптической плотности с максимумом поглощения при 520 нм.

Зарегистрированные нами различия спектров поглощения и их временной зависимости при использовании двух реагентов можно, по-видимому, объяснить с позиций теории восстановления ЗХВК по механизму зародышеобразования Жигмонди [14, 15]. Такой механизм реализуется, вероятно, в случае с цитратом натрия. Согласно данной теории, формированию "зрелых" частиц КЗ при достаточной активности восстановителя предшествуют этапы образования зародышей новой фазы и их обратной агрегации (пептизации) с образованием структур, размер которых заметно превосходит конечный размер взвешенных золотых частиц. Этим, возможно, и обусловлены появление и последующая трансформация максимума поглощения при $\lambda = 700$ нм при использовании цитрата натрия.

Активность ПЭИ в качестве восстановителя ЗХВК оказалась заметно ниже. К тому же, обладая достаточно большой молекулярной массой и адсорбируясь на поверхности частиц

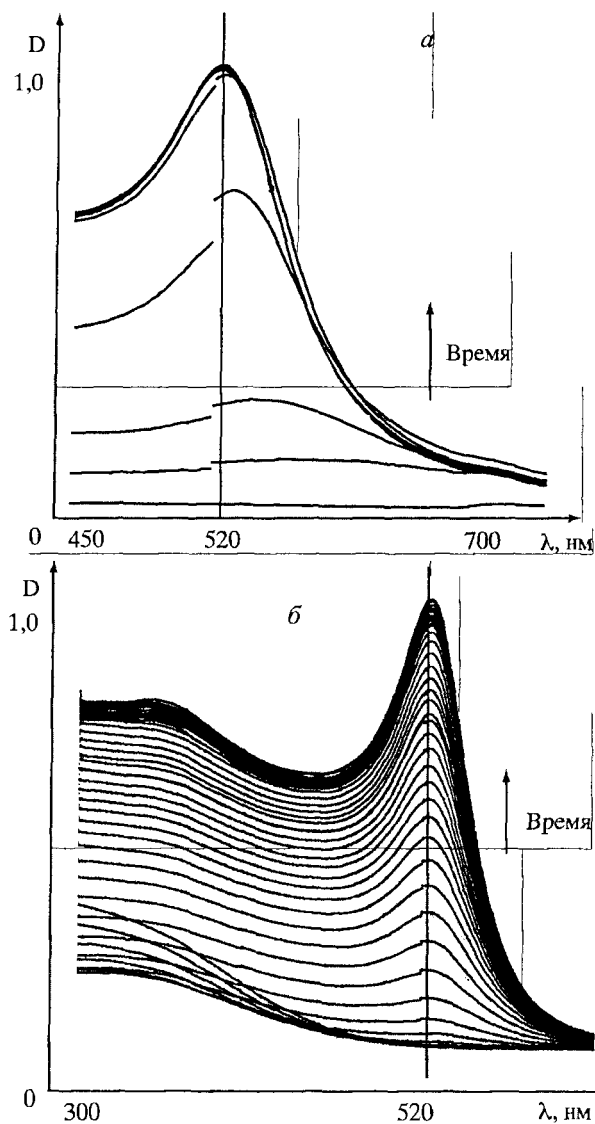


Рис. 2.4. Изменение во времени спектров поглощения золей золота в процессе восстановления ЗХВК цитратом натрия (а) и полиэтиленмином (б)

(обладающих относительно большим отрицательным зарядом), данное соединение (подобно аминокдекстранам) оказывает стабилизирующее действие на суспензию КЗ. Все это ограничивает критический размер зародышей новой фазы на уровне, сопоставимом по порядку величины с конечным размером частиц КЗ, уменьшает скорость их роста и препятствует пептизации. Об этом свидетельствует стабильность во времени положения максимума полосы поглощения света формирующейся суспензии при $\lambda = 520$ нм.

В данном случае, по-видимому, мы имеем дело с механизмом, принципиально отличным от теории Жигмонди. На начальных этапах, возможно, происходит адсорбция ионов золота на полимерных цепях с их последующим восстановлением на функциональных группах полимера (например, альдегидных и гидроксильных). Агрегации зародышей при этом не происходит, очевидно, из-за стабилизирующего действия полимера. Это подтверждается результатами ЭМ исследований, согласно которым часть восстановленного КЗ при недостатке ПЭИ наблюдается в виде весьма мелких частиц (порядка 1 нм), вероятно, зародышей, адсорбированных на полимерных цепях. В результате оказывается возможным образование ассоциатов полимерных цепей с частицами КЗ обоих типов (как зрелых частиц, так и стабилизированных зародышей), что иллюстрирует рис. 2.5.

Кроме того, в качестве восстановителей нами были использованы и другие высокомолекулярные вещества, в частности, ПЭГ с молекулярной массой 20000 и 200 и поливинилпирролидон (10000). Данные вещества применяли при различных условиях эксперимента (концентрация, температура, порядок смешения реагентов). По данным спектрофотометрии и визуальным наблюдениям процесс восстановления ЗХВК в этих случаях мало отличался от имевшего место при применении ПЭИ. Однако, характерные черты кинетики этого процесса весьма существенно отличались от кинетики цитратного восстановления ЗХВК.

По аналогии с описанным выше процессом восстановления ЗХВК синтетическими полимерами, мы проанализировали возможность одностадийного получения маркера также и с исполь-

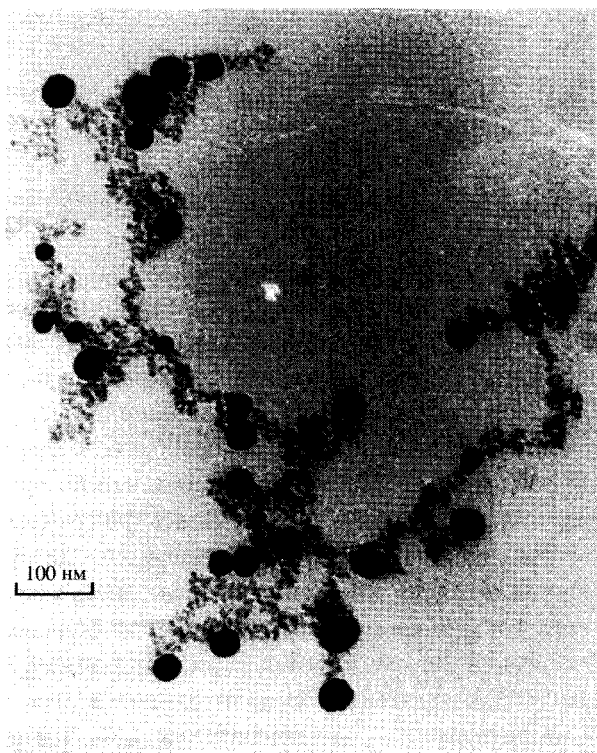


Рис. 2.5. Электронная микрофотография частиц КЗ, полученных восстановлением ЗХВК полиэтиленимином при недостатке восстановителя

нованием в качестве восстановителя белка — козьих антикриолических иммуноглобулинов класса G (IgG).

Визуально и по данным спектрофотометрии было установлено, что при нагревании смеси ЗХВК с белком до 70°C образования КЗ не происходит. Дальнейший нагрев не имел смысла, поскольку белок терял нативность вследствие тепловой денатурации. Тогда была предпринята попытка получить биоспецифический маркер, используя для восстановления ЗХВК одновременно с белком, сильный низкомолекулярный восстановитель борогидрид натрия. Напомним, что в случае его применения возможно получение КЗ с относительно малым размером

частиц (3–5 нм), причем при комнатной температуре. Для этого в колбу к 49 мл воды и 0,5 мл 1% водного раствора ЗХВК добавляли 3 мг белка и 200 мкл 0,2 М водного раствора карбоната калия при энергичном перемешивании. Затем к данной смеси быстро добавляли 200 мкл 0,5% холодного водного раствора борогидрида натрия. В результате образовывался золь оранжевой окраски с тем же размером частиц 5 нм ($\lambda_{\max} = 513$ нм), что и в случае борогидридного восстановления ЗХВК без белка.

Полученный маркер — конъюгат КЗ с IgG проверяли на работоспособность методом дот-анализа. На полоски нитроцеллюлозы наносили по 1 мкл сыворотки крови кролика в ряде последовательных двойных разведений. Выявление проводили маркерами, полученными традиционным способом и по оригинальной одностадийной методике. На рис. 2.6 видно, что по чувствительности выявления АГ оба маркера оказались фактически эквивалентными, о чем свидетельствует практически одинаковая степень окрашивания пятен на обеих полосках нитроцеллюлозы.

Отмечено, что при совместном применении белка и низкомолекулярного восстановителя (борогидрида натрия) процесс восстановления ЗХВК протекает относительно быстро. Это происходит, по-видимому, за счет высокой активности низкомолекулярного компонента. В результате зародышевые частицы не успевают адсорбироваться на полимере. Следовательно, в данном случае с большой вероятностью реализуется классический механизм формирования КЗ с последующей адсорбцией белка на поверхности зрелых частиц. К подобным результатам пришли и авторы работ [244–246].

Полученные результаты позволяют констатировать, что, выбирая тот или иной восстановитель и принимая во внимание особенности кинетики формирования коллоидной фазы, можно получать готовые маркеры с заданным размером частиц КЗ. Именно этот принцип мы применили при получении конъюгата ПЭИ-КЗ со средним диаметром частиц золота 20 нм. Данный маркер был использован нами для определения относительной гидрофобности клеток почвенных микроорганизмов [247].

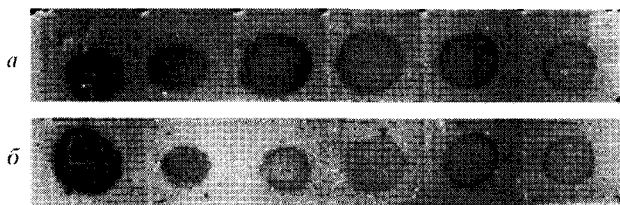


Рис. 2.6. Результаты дот-анализа кроличьей сыворотки с использованием антикроличьих IgG, меченных КЗ: *а* — маркер получен традиционным способом; *б* — использована оригинальная одностадийная процедура получения биомаркера

2.7. Получение золотых несферических наночастиц

Несферические наночастицы благородных металлов представляют большой интерес из-за их уникальных оптических свойств, обусловленных настраиваемым продольным плазмонным резонансом [248–250]. Зависимость плазмонного резонанса от диэлектрического окружения лежит в основе развиваемых в настоящее время биомедицинских приложений золотых и серебряных наночастиц как элементарных оптических биосенсоров, преобразующих эффекты специфических взаимодействий закрепленных на частицах молекул-зондов с молекулами-мишенями в детектируемый оптический сигнал [127, 138, 139, 154]. Вследствие высокой яркости [148, 251] и повышенной чувствительности резонансного рассеяния к диэлектрическому окружению (по сравнению с эквиобъемными сферами [252, 253]) несферические наночастицы имеют многообещающие перспективы использования в биомедицинских диагностических целях с применением световой микроскопии темного поля [123, 254–256]. Мы хотим специально отметить, что существовавшие до недавнего времени проблемы с функционализацией наностержней биомолекулами в самое последнее время начали успешно решаться [257–259].

Образование несферических частиц в изотропной среде — нетипичное явление, поэтому для направленного синтеза нано-

стержней создают искусственно анизотропные условия роста. В частности, был предложен метод электрохимического осаждения металлов в материалах с цилиндрическими пора́ми (жестких матрицах), таких как оксиды кремния или алюминия [188, 260, 261].

Другим методом получения наностержней является восстановление ЗХВК в присутствии так называемых мягких матриц, представляющих собой мицеллярный раствор ионных ПАВ [262, 263]. Известно, что в определенных условиях водные растворы ионных ПАВ способны образовывать несферические мицеллы [264]. Принцип метода мягких матриц заключается в диффузионно-контролируемом росте частиц с использованием несферических мицелл как анизотропной фазовой границы. Наиболее популярным ПАВ, используемым для этой цели, является цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) [262]. В концентрированных растворах ЦТАБ могут формироваться цилиндрические мицеллы, которые, возможно, принимают участие и в формировании наностержней, и в их стабилизации [262]. Для более полного ознакомления с методами синтеза наночастиц, их физико-химическими свойствами и многочисленными приложениями мы рекомендуем читателям хороший обзор [164] и, в особенности, недавние обзоры [265–267], которые специально посвящены анизотропным наноструктурам.

Зародышевый метод получения наностержней был предложен группой К. Мёрфи [262], а затем усовершенствован этими же авторами [268] и в группе М. Эль-Сайеда [263]. Данный подход позволил развить эффективную технологию для синтеза стержнеобразных наночастиц с управляемыми геометрическими параметрами [164, 263, 268, 269].

Согласно [263], один из возможных механизмов роста наностержней в присутствии ПАВ состоит в следующем. В растворе ПАВ формируются анизотропные мицеллы, размеры которых зависят от концентрации ПАВ и ионной силы раствора. При добавлении зародышевых частиц к ростовому раствору, они покрываются молекулами ПАВ и включаются в мицеллы. Восстановление ЗХВК на зародышах приводит к формированию наностержней с геометрией, определяемой анизотропией мицел-

лы. Мёрфи и др. [270] разработали механизм роста, основанный на преимущественной адсорбции молекул ПАВ на боковых сторонах стержня, в результате чего диффузионный рост возможен только со стороны торцов (авторы [270] назвали эту модель “*zipping*” mechanism). В работе [271] анализировался электрохимический механизм роста наностержней, в котором существенная роль отводится электрическим силам, обусловленным анизотропией двойного электрического слоя около растущей несферической частицы. Мониторинг роста наностержней с помощью атомно-силовой микроскопии описан в [272].

В нашей работе мы использовали процедуру синтеза наностержней, аналогичную [263]. Поскольку выход наностержней был довольно низким, то мы ввели в методику [263] новый этап, основанный на разделении наночастиц в градиенте концентрации глицерина. Такая процедура представляется нам более эффективной, чем обычное центрифугирование, используемое для концентрирования наностержней и удаления избытка ПАВ [262, 273]. Особое внимание мы уделяем также анализу физико-химических параметров, которые управляют морфологией синтезируемых частиц. В частности, важная роль ионов серебра, определяющих форму частиц, оставалась, по мнению авторов [269], невыясненной. Однако недавние публикации [274, 275] позволяют сформулировать вполне правдоподобные гипотезы (см. обсуждение этого вопроса ниже).

В отличие от обычного зеленого 520-нм резонанса золотых наносфер в воде, спектры поглощения стержнеобразных наночастиц имеют четко выраженный длинноволновой резонанс в красной и ближней ИК области [248, 260, 262, 276]. Спектральное положение длинноволнового (продольного) резонанса почти линейно зависит от отношения длины к диаметру наностержней [277–281], тогда как поперечный поверхностный плазмонный резонанс немного смещается в коротковолновую область спектра для более удлиненных частиц. По данным ряда групп и нашим собственным наблюдениям, продольный резонанс со временем дрейфует в коротковолновую область. Эта важная проблема была недавно решена в [269] добавлением Na_2S в ростовой раствор.

Au-Ag наностержни мы синтезировали по методу [263] с незначительными модификациями, касающимися концентраций некоторых реагентов и условий реакции. На этапе формирования зародышей ультрадисперсные золотые золи с частицами диаметром 4-6 нм [263] были синтезированы в присутствии ЦТАБ. На втором этапе эти, покрытые ПАВ, частицы были использованы в качестве зародышей для роста наностержней.

Приготовление зародышевого раствора:

1 мл 0,1 М водного раствора ЦТАБ был смешан с 25 мкл 0,01 М ЗХВК в воде;

к этому раствору добавляли 100 мкл свежеприготовленного в ледяной воде 0,01 М NaBH_4 и интенсивно перемешивали не более 1 мин.

После добавления NaBH_4 цвет зародышевого раствора изменялся от слегка желтого до желтовато-коричневого. Полученные зародыши использовали в течение 2-3 часов, поскольку в дальнейшем имеет место "старение" зародышей, что проявляется в смене цвета раствора на розовый.

Выращивание Au-Ag наностержней:

9,5 мл водного раствора ПАВ (0,1 М ЦТАБ или 0,075 М бензилдиметилгексадециламмонийхлорид (БДАХ) / 0,055 М ЦТАБ) смешивали с варьируемым объемом 0,004 М водного раствора AgNO_3 (от 50 мкл до 250 мкл в зависимости от требуемого размера наностержней);

к этому раствору добавляли 500 мкл 0,01 М ЗХВК; затем, при интенсивном перемешивании, как можно быстрее добавляли 100 мкл 0,08 М аскорбиновой кислоты; в этот ростовой раствор добавляли свежеприготовленный зародышевый раствор (от 6 до 18 мкл).

Аскорбиновая кислота как умеренный восстановитель в присутствии бромид-ионов ЦТАБ изменяет цвет ростового раствора от темно-желтого до бесцветного. После добавления зародышей цвет раствора постепенно изменяется в течение 5-15 мин. Полное время синтеза наностержней занимает несколько часов. Финальный цвет системы зависит от размера (осевого отношения) наностержней. Полученные образцы обозначаются далее в соответствии с положением длинноволнового пика экстинкции

(продольного плазмонного резонанса наностержней), например, NR-655.

Для предварительного концентрирования наночастиц (15000 г, 3 мин) использовали центрифугу "Type 320a" (Mechanika Precyzyjna, Польша). Слегка окрашенный супернатант удаляли и не использовали. Темно-пурпурный или синий (в зависимости от осевого отношения частиц) подвижный маслянистый осадок аккуратно наслаивали поверх ступенчатого градиента глицерина (50–10%, шаг 10%) по 1 мл каждой ступени в центрифужной пробирке общим объемом 10 мл. Эти пробирки центрифугировали в бакет-роторе. Расстояние от оси ротора до ближней границы растворителя — 5,5 см, до конца пробирки — 9 см. Время центрифугирования подбирали таким образом, чтобы основная полоса оседающих частиц находилась в зоне 30% глицерина. Приблизительное время оседания рассчитывали по формуле

$$t = \sum_{i=1}^n t_i, \quad (2.6)$$

где n — количество ступеней градиента, и

$$t_i = \frac{9\eta_i \ln(x_i/x_{0i})}{2R_{ev}^2(\rho - \rho_{0i})\omega^2}, \quad (2.7)$$

где x_i — расстояние от оси ротора до дальней границы i -й зоны постоянной концентрации глицерина, x_{0i} — расстояние от оси ротора до ближней границы этой зоны, η_i — вязкость соответствующего раствора глицерина, ρ_{0i} — его плотность, R_{ev} — радиус частиц золота (сферы эквивалентного объема), ρ — плотность золота, ω — угловая скорость вращения ротора. Во избежание коагуляции наночастиц в процессе центрифугирования использовали растворы глицерина с небольшим содержанием ПАВ (0,001 М ЦТАБ).

Контролируемое управление геометрическими параметрами наностержней предполагает понимание основных механизмов роста частиц в мицеллярных системах. На сегодняшний день достигнут определенный прогресс в таком понимании для двух существенно различающихся случаев: рост частиц без добавления

и с добавлением ионов серебра в реакционную смесь. В первом случае (без ионов серебра), одной из моделей является механизм электрически-направленного роста [265], согласно которому ионы AuCl_4^- связываются с мицеллами ЦТАБ, восстанавливаются аскорбиновой кислотой от Au^{3+} до Au^+ и формируют мицеллы типа AuCl_2 -ЦТАБ. Диффузионный рост частиц контролируется скоростью столкновения зародышей (защищенных ПАВ) и комплексов AuCl_2 -ЦТАБ. По мнению авторов [265], эта скорость больше на концах комплексов за счет анизотропии электрического поля, что определяет анизотропный рост частиц.

Группа Мёрфи [270, 275] разработала модель, в которой преимущественный рост со стороны торцов объяснялся преимущественной адсорбцией молекул ПАВ на боковых гранях частиц, в результате чего зародыши могут диффундировать только к торцевым участкам растущего стержня. Обоснование этой модели было дано в работе [282], где был показан внутренний структурный механизм нарушения симметрии на начальной стадии роста (сдваивание зародышей), который затем усиливается за счет внешнего механизма роста. Движущей силой внешнего анизотропного роста является различие в кристаллической структуре боковых $\{100\}$ и торцевых пентагональных $\{111\}$ граней, в результате чего стержень растет вдоль общей $\{110\}$ оси.

Механизм роста в присутствии ионов серебра до сих пор остается предметом исследования. В частности, в [269] было показано, что в отсутствие AgNO_3 наряду со стержнями формируются частицы различной формы с явно выраженными гранями. Кроме того, на ранних этапах роста не образуются стержни с утолщенными концами, которые наблюдаются при синтезе с добавлением AgNO_3 .

Наиболее правдоподобный механизм, по авторитетному мнению Мёрфи [275], был предложен в работе [274]. Методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (HRTEM) было показано, что методика синтеза зародышей, разработанная в группе Эль-Сайеда [263], дает монокристаллические зародыши (порядка 1,5 нм), в то время как методика группы Мёрфи [268] дает двойниковые (twinned) кристаллы (размер около 3 нм), имеющие пентагональную симметрию. Именно

этим, по мнению авторов [274], объясняется загадочное различие влияния ионов серебра на дальнейший рост частиц в двух методиках. Золотые наностержни растут на зародышах первого типа, в то время как вторые приводят к формированию бипирамид (называвшихся в [268] φ -частицами). Принципиальным отличием от модели роста в отсутствии ионов серебра [275] состоит в том, что в случае монокристаллических зародышей формируются боковые грани типа $\{110\}$ и торцы типа $\{100\}$. Механизм роста связан с понижением потенциала восстановления (ППВ) серебра на золотой поверхности (т.е. восстановление Ag^+ до Ag^0 происходит на субстрате, имеющем меньший поверхностный потенциал, чем стандартный потенциал восстановления Ag^+). Анизотропия роста обусловлена тем, что положительный сдвиг ППВ серебра оказывается большим для торцевых $\{100\}$ граней, чем для боковых поверхностей типа $\{110\}$ или $\{111\}$. Это позволяет предположить более быстрое восстановление серебра на боковых гранях зародыша, связывание молекул ПАВ с боковыми гранями и ингибирование диффузионного роста частиц в направлении боковых граней. В свою очередь, такой механизм согласуется с экспериментальным наблюдением, что увеличение концентрации ионов серебра приводит к формированию более вытянутых частиц.

Таким образом, в системе с единственным ПАВ золотые наностержни требуемой длины могут быть получены изменением содержания серебра в ростовом растворе. Этот прием дает воспроизводимый рост наностержней с осевым отношением в пределах 1,5–4,5 [263]. Однако увеличение концентрации ионов серебра выше некоторого предела может приводить к формированию “звездообразных” частиц [283] (такие частицы могут быть также получены при использовании 10-нм золотых зародышей [284]). Отношением длины к диаметру наностержней можно управлять в диапазоне от 1 до 7, изменяя соотношение количества зародышей и ЗХВК. Стержни с большим осевым отношением могут быть получены путем тщательного контроля за условиями роста, например, увеличением времени роста или постепенным дробным добавлением ростового раствора [262]. В частности, в работе [283] было показано, что дробное добавление ростового

раствора приводит сначала к формированию веретенообразных частиц, которые постепенно превращаются в наностержни с осевым отношением вплоть до 70. В данном разделе мы рассматриваем только одношаговые методики, считая с момента объединения ростового и зародышевого растворов. Количественные соотношения сурфактантов и косурфактантов также играют роль параметра, управляющего формой наностержней. Мы исследовали системы двух ПАВ с одинаковыми гидрофобными хвостами (гексадецил) и различными по геометрии и ионному составу гидрофильными головками (триметиламмонийбромид и бензилдиметиламмонийхлорид).

На рис. 2.7 представлено изменение во времени спектров экстинкции растущих Au-Ag наностержней. Также показаны спектры экстинкции зародышевого (1) и ростового (2) растворов. Спектры экстинкции Au-Ag наностержней были измерены через 2, 5, 30 и 60 мин после добавления зародышей к ростовому раствору и через несколько часов, когда рост частиц уже остановился. Данные спектры позволяют проследить временную динамику роста частиц. Формирование несферических наночастиц, как и предполагалось, происходит в первые пять минут после добавления зародышей, что соответствует изменению цвета раствора с бесцветного до сине-сиреневого. Из рис. 2.7 также видно, что существенные изменения спектров (и связанные с ними изменения размеров и концентрации наностержней) наблюдаются в первые 20–40 мин, после чего процесс роста выходит на насыщение.

Хотя кинетические изменения в спектрах находятся в общем согласии с наблюдениями [263], можно отметить некоторые отличия. Именно, в начальный интервал времени мы регистрировали длинноволновый резонанс, который постепенно смещался в синюю сторону. В противоположность этому, авторы работ [263] и [271] наблюдали непрерывное смещение продольного резонанса в красную сторону. Кроме того, их спектры не обладали слабым синим плечом, которое явно заметно в наших спектрах, а также в спектрах работы [271]. Ниже показано, что это плечо связано с присутствием сферических и кубических частиц, которые формируются как побочные продукты синтеза.

Синий дрейф продольного резонанса на конечных стадиях синтеза (ср. спектры 4–7, рис. 2.7) является интересной особенностью наших спектральных измерений [277, 285], согласующихся с данными работ [269, 286]. Теоретически [287] такой дрейф можно объяснить уменьшением осевого отношения за счет увеличения толщины наностержней (при неизменной длине), уменьшением длины (при неизменной толщине) или латеральной агрегацией некоторой доли частиц. Недавние тщательные исследования [269] показали, что в присутствии ионов серебра на первом этапе формируются частицы с небольшими утолщениями на концах, которые потом дорастают до частиц, похожих на s-цилиндры. Кроме того, наностержни, покрытые ЦТАБ, кинетически нестабильны и их длина постепенно уменьшается со временем. Оба эти фактора обуславливают синий дрейф продольного резонанса.

Как уже отмечалось выше, величина мольного отношения серебра к золоту является важным управляющим параметром синтеза золото-серебряных стержней. По данным [263] с ростом доли серебра происходит увеличение длины наностержней, но при значениях мольного отношения Ag/Au более $1/6$ осевое отношение наночастиц уменьшается.

На рис. 2.8а представлены спектры наностержней, полученных при различных значениях отношения Ag/Au в ростовом растворе (от $1/25$ до $1/3$). Как видно из данных графиков, с

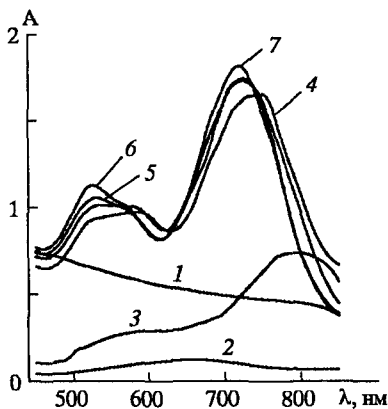


Рис. 2.7. Оптический контроль кинетики синтеза наностержней по спектрам экстинкции раствора зародышей (1), ростового раствора (2) и суспензии Au-Ag наночастиц через различные промежутки времени после добавления зародышей в ростовой раствор: через 2 (3), 5 (4), 30 (5), 60 мин (6) и 17 ч (7) после добавления зародышей

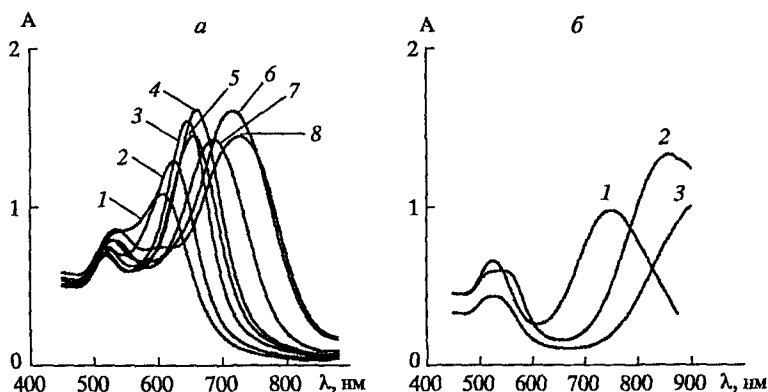


Рис. 2.8. Спектры экстинкции наностержней, полученных с единственным ПАВ (а) при значениях мольного отношения Ag/Au в ростовом растворе 1/25(1), 1/12(2), 1/8(3), 1/6(4), 1/5(5), 1/4(6), 1/3,8(7), 1/3(8) и в смеси ЦТАБ/БДАХ $\approx 0,7$ (б) при $\text{Ag}/\text{Au}=1/8(1)$, 1/6(2), 1/5(3)

увеличением этого отношения до 1/6 включительно (кривые 1–4) продольный резонанс смещается в красную сторону, что соответствует увеличению осевого отношения частиц. Однако при дальнейшем увеличении доли серебра наблюдается попеременно то синий, то красный сдвиг максимума (кривые 5–8). Возможно, это связано с конкуренцией двух факторов, влияющих на положение максимума: доли серебра в составе частиц и длины наностержней. Серебряные наночастицы имеют спектр поглощения, существенно сдвинутый в коротковолновую область по сравнению с аналогичными золотыми частицами. По данным атомно-абсорбционной спектроскопии [275], отношение молярного содержания серебра и золота в частицах может составлять от 0,02 (короткие стержни) до 0,05 (длинные стержни с осевым отношением порядка 5), поэтому синий сдвиг за счет увеличения доли серебра в составе частицы может быть вполне вероятным. С другой стороны, продольный резонанс очень чувствителен к осевому отношению. Поэтому при последующем увеличе-

нии концентрации ионов серебра, увеличение длины наностержней будет приводить к обычному красному сдвигу продольного резонанса. Конечно, для подтверждения такой гипотетической модели нужны тщательные морфологические ЭМ измерения на этапах синтеза наностержней.

Для синтеза золото-серебряных наностержней с большими значениями фактора формы (длина волны продольного резонанса более 850 нм) авторы [263] предложили использовать смесь ПАВ (ЦТАБ и БДАХ). В данном случае управляющим параметром формы является отношение концентраций этих двух ПАВ (мольное отношение ЦТАБ/БДАХ от 1/25 до 2/5 при постоянном мольном отношении $\text{Ag}/\text{Au} = 1/6$). Наши эксперименты показали, что для синтеза НСт с большими значениями фактора формы использование в качестве управляющего параметра мольного отношения серебра к золоту при постоянном значении мольного отношения двух ПАВ также эффективно. На рис. 2.8б представлены спектры поглощения наностержней, синтезированных в присутствии двух ПАВ (ЦТАБ/БДАХ = 0,7) при различных значениях отношения Ag/Au (1/8, 1/6, 1/5). С увеличением доли серебра происходит увеличение осевого отношения наностержней.

Эффективным управляющим параметром фактора формы наностержней является количество зародышей, добавляемых в ростовой раствор. В работе [271] отмечалась антибатная зависимость длины золотых наностержней от количества зародышей. Однако по нашим данным, представленным на рис. 2.9а, увеличение добавляемого количества зародышей приводит к сдвигу продольного резонанса в длинноволновую область и, следовательно, к увеличению осевого отношения наностержней. Для случая смеси двух ПАВ при постоянном значении мольного отношения серебра к золоту имеет место та же тенденция: с увеличением добавляемого количества зародышей происходит красный сдвиг продольного резонанса (рис. 2.9б).

Для отделения Au-Ag наностержней от побочных частиц и избытка ЦТАБ мы использовали процедуру седиментационного разделения. Свежеприготовленные наностержни разделяли градиентным центрифугированием, как отмечено выше. В результате центрифугирования в пробирках образовывались три различные фракции. Верхняя (первая) фракция имела темно-синий цвет, средняя — фиолетовый и нижняя — розовый.

Качественное представление об усредненной дисперсной структуре всех трех фракций можно получить из спектров экстинкции, приведенных на рис. 2.10. Очевидно, что первая (верхняя) фракция содержала наибольшее количество наностержней, поскольку спектр этой фракции хорошо согласуется с теоретическими расчетами для таких систем [276, 278]. Во второй фракции содержались как наностержни, так и частицы других форм, на что указывает выраженное плечо в области 570 нм. Сопоставляя спектр 2 на рис. 2.10 с данными работы [288], мы предполагаем, что фракция 2 содержала смесь частиц стержнеобразной, кубической и сферической формы. И, наконец, четкий плазмонный резонанс третьей фракции около 570 нм соответствует расчетам работы [288] для кубических частиц. Таким образом, исчезновение плеча в спектре первой фракции связано с существенным уменьшением количества кубических и сферических частиц, которые перешли во вторую и третью фракции. Отметим, что седиментационное разделение уменьшает, но не устраняет вовсе наличие частиц с седиментационными параметрами, близкими к наностержням. Для примера мы приводим на рис. 2.10 ЭМ фотографию сепарированного препарата NR-655, где стрелками показаны несколько частиц, похожих на кубы и сферы. Тем не менее, оптические спектры (вместе с ЭМ данными) однозначно свидетельствуют об улучшении качества препаратов после градиентного сепарирования.

Среди многочисленных типов наноструктур, ставших доступными благодаря быстрому прогрессу в технологиях синтеза,

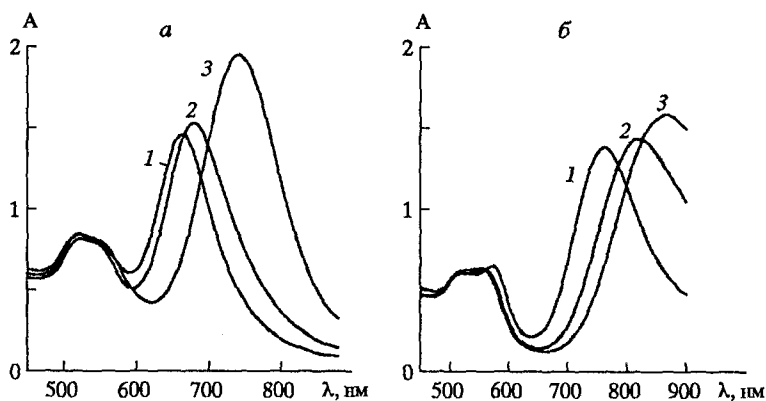


Рис. 2.9. Спектры экстинкции наностержней синтезированных при единственном ПАВ (а), двух ПАВ (б) (ЦТАБ/БДАХ=0,7) и разных количествах добавляемых зародышей: 6(1), 12(2) и 18(3) мкл

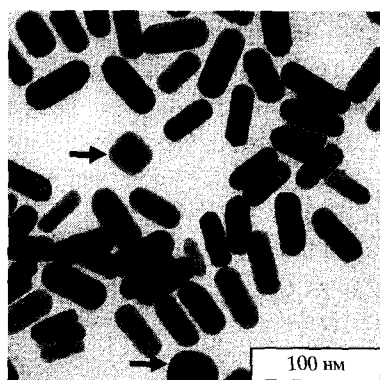
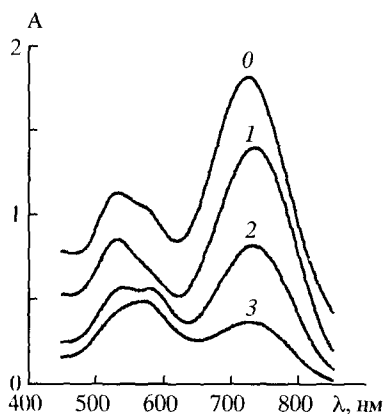


Рис. 2.10. Спектры экстинкции суспензии наночастиц NR-733 до (0) и после фракционирования (цифры у кривых 1–3 соответствуют номерам фракций). ЭМ фотография соответствует нефракционированному образцу NR-655, стрелками показаны сферические и кубические частицы, оставшиеся после седиментационного разделения

наряду с наностержнями значительный интерес для биосенсорики, иммунодетекции, оптической визуализации биообъектов и лазерной фотодеструкции раковых клеток представляют золотые “нанооболочки”, “нанозвезды”, “наноклетки” и др. [50, 284, 289–291].

Наиболее удобным способом контроля процессов образования металлоколлоидов являются методы спектроскопии поглощения и рассеяния света. Поэтому следующая глава посвящена исследованию оптических свойств золей коллоидных металлов, главным образом, золота.

3. ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ГИДРОЗОЛЕЙ

Изучение оптических свойств золей золота и других металлов, начатое пионерскими работами Фарадея [12], Жигмонди [13] и Ми [6], ведется уже более 150 лет. Обзор многочисленных работ по оптическим свойствам золотых частиц, суспендированных в воде, стеклянных матрицах, хлористом калии, желатине, полиметилметакрилате и других средах (а также напыленных на различные подложки) можно найти в книге [22] и в статье [292]. Повышение интереса к золотым ультрадисперсным золям, отмечаемое в последние два десятилетия (см., например, книгу [61] и фундаментальное руководство [59]), связано с многочисленными применениями КЗ в медико-биологических исследованиях.

Другая причина повышенного интереса к оптическим свойствам золотых золей связана с недавним обнаружением фрактальных свойств в структуре коллоидных агрегатов. Золи золота оказались удобной экспериментальной моделью, а оптические методы — наиболее информативным инструментом исследования основных универсальных закономерностей фрактальной агрегации. Недавно теоретически [108, 109, 293, 294] и экспериментально [110, 111] было показано, что фрактальная природа кластеров из металлических частиц приводит к уникальным оптическим свойствам. В частности, было показано, что оптические возбуждения в кластере имеют коллективную природу (делокализованы по многим мономерам), поэтому полоса поглощения в области плазмонного резонанса изменяется специфическим образом. Оптические поля, действующие на индивидуальную частицу в кластере, могут существенно превышать среднее поле, что приводит к гигантским нелинейным эффектам и даже к необратимым изменениям в спектрах поглощения [111,

295]. С учетом этих теоретических и экспериментальных фактов детальное изучение спектральных свойств как самих золей золота, так и их конъюгатов с биомакромолекулами представляет, как нам кажется, несомненный интерес.

Совсем недавно новые литографические методы, так же как усовершенствования классических “влажных” методов химии, позволили синтезировать наночастицы благородных металлов в широких пределах размеров, форм и диэлектрического окружения. В статье [296] описывается прогресс, достигнутый в последнее время в теории оптических свойств наночастиц, в частности, методы решения уравнений Максвелла для рассеяния света от частиц произвольной формы в окружении сложного состава. Было включено описание качественных особенностей дипольного и квадрупольного резонансов плазмонной волны для сферических частиц; обсуждены аналитические и численные методы расчета сечений экстинкции и рассеяния, локальных полей и другие оптические свойства для несферических частиц.

3.1. Поверхностный плазмонный резонанс

Темно-красный цвет золотых золей в жидких и твердых растворах отражает поверхностную плазмонную полосу. Широкая полоса поглощения в видимой области (приблизительно 520 нм) возникает из-за коллективных колебаний электронного газа на поверхности наночастиц (6s электроны полосы проводимости для Au, Ag, Cu), которые коррелируют с электромагнитным полем облучающего света, то есть возбуждением когерентного колебания полосы проводимости [297]. Поскольку плазмонные волны на высоких частотах локализованы вблизи поверхности металлов (скин-слой), резонансная поляризуемость металлических наночастиц носит название поверхностной (или локализованной поверхностью). Изучение поверхностного плазмонного резонанса (ППР) стало областью очень активного исследования и с научной и с технологической точек зрения, особенно

когда частицы включены в ионные матрицы или стекла. ППР обеспечивает значительное количество информации относительно образования резонансной полосы поглощения в металлах и был предметом обширного изучения оптических спектроскопических свойств металлических наночастиц.

Природа ППР была рационализирована в публикации Густава Ми 1908 г. [6]. Согласно теории Ми, полное сечение ослабления состоит из поверхностного плазмонного поглощения и рассеяния и задается суммированием по всем электрическим и магнитным колебаниям. Резонансы, обозначенные как поверхностные плазменные волны (плазмоны), были описаны количественно через решение уравнений Максвелла для сферических частиц с соответствующими граничными условиями. Теория Ми приписывает плазмонную полосу сферических частиц дипольным колебаниям свободных электронов проводимости с энергетическим состоянием непосредственно выше уровня Ферми [298]. Все многочисленные последующие и недавние сообщения соотносят спектроскопическое поведение Au, Ag и Cu наночастиц с теорией Ми [23, 299–302].

Оптические свойства наночастиц золота с диаметром менее 40 нм достаточно точно описываются дипольным рэлеевским приближением [22, 303], согласно которому коэффициенты рассеяния и поглощения даются формулами, следующими из обычной электростатики диполя в диэлектрической среде:

$$Q_{abs} = 4(kR)\text{Im}\left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m}\right), \quad (3.1)$$

$$Q_{sca} = \frac{8}{3}(kR)^4 \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right|^2, \quad (3.2)$$

где ε_m — диэлектрическая проницаемость внешней среды, а ε — диэлектрическая проницаемость частицы. Коэффициент экстинкции обусловлен поглощением и рассеянием [303]

$$Q_{ext} = Q_{abs} + Q_{scat}. \quad (3.3)$$

Отметим, что при малых значениях размеров частиц основной вклад в ослабление света вносит поглощение, а влиянием

рассеяния можно пренебречь. Параллельный пучок света, проходящий через взвесь наночастиц, ослабляется в соответствии с законом Бугера:

$$J/J_0 = \exp(-\tau l) = 10^{-A}. \quad (3.4)$$

Оптическая плотность дисперсной системы A определяется суммой потери энергии светового пучка на отдельных частицах и может быть представлена в виде [303, 304]:

$$A = \ln N Q_{ext} \pi R^2 l, \quad (3.5)$$

где N — число частиц в единице объема.

Из формул (3.1) и (3.2) очевидно, что коэффициент ослабления будет стремиться к бесконечности в случае, когда знаменатель дроби стремится к нулю или

$$\varepsilon \approx -2\varepsilon_m. \quad (3.6)$$

Условие (3.6), собственно, и называется условием плазмонного резонанса [22]. Комбинируя условие (3.6) с элементарной формулой Друде для частотной зависимости диэлектрической проницаемости металла, можно получить теоретическую оценку для резонансной длины волны [305]:

$$\lambda_{\max} = \lambda_p \sqrt{\varepsilon_\infty + 2\varepsilon_m}, \quad (3.7)$$

где для золота $\varepsilon_\infty = 12,2$ и значение длины волны плазменных колебаний электронов проводимости равно $\lambda_p = 131$ нм [306]. Подставляя значения всех констант в (3.7), находим $\lambda_{\max} \approx 520$ нм. Таким образом, спектр поглощения и рассеяния малых золотых частиц имеет максимум при длинах волн вблизи 520 нм. Соответственно, в проходящем свете золи золота имеют красный цвет (вычитается зеленый), впервые объясненный в классической работе Ми [6].

В случае рассеяния света на золотых частицах большего размера ($R \geq \lambda/20$) представление коэффициентов поглощения и рассеяния в рэлеевском (дипольном) приближении (3.1) и (3.2)

неверно и требуется расчет по теории Ми. В данном случае положения спектральных максимумов поглощения и рассеяния для золя золота будут отличаться и зависеть от размера частиц. Эти зависимости позволяют построить калибровочные кривые для оперативного определения размера частиц золя по положению спектрального максимума экстинкции [307] или дифференциального рассеяния под углом 90° [308]. Очень эффектно размерная зависимость максимума рассеяния демонстрируется на цветных микрофотографиях отдельных частиц, сделанных при темнопольном освещении [123, 309].

Положение максимума плазмонного резонанса экстинкции зависит также от диэлектрического окружения частицы [22, 310, 311], например, от толщины и структуры адсорбционного слоя. Детальный анализ двухслойной и многослойной оптических моделей биоконъюгатов коллоидного золота (включая расчеты спектров экстинкции и бокового рассеяния, а также экспериментальную проверку моделей) приведен в статьях [221, 305] и более подробно будет обсужден ниже.

Таким образом, главные характеристики ППР золотых сферических наночастиц можно сформулировать следующим образом:

- положение в области приблизительно 520 нм;
- резкое уменьшение амплитуды с уменьшением размера ядра Au частицы до 1,4–3,2 нм из-за проявления квантовых размерных эффектов (заметных для частиц диаметром менее 3 нм) приводящих к небольшому фиолетовому смещению [299, 312];
- уменьшение интенсивности ППР как следствие уменьшения размера частицы сопровождается уширением плазмонной полосы пропускания;
- пошаговое спектральное структурирование, указывающее на переходы к дискретным незанятым уровням полосы проводимости для монодисперсных золотых наночастиц с диаметрами между 1,1 и 1,9 нм [300, 301, 306].

Следовательно, ППР отсутствует для золотых наночастиц с диаметром меньше 2 нм, так же как для компактного золота. Для золотых наночастиц среднего диаметра 9, 15, 22, 48, и 99 нм максимум ППР (λ_{\max}) наблюдался при 517, 520, 521, 533, и

575 нм, соответственно, в водных средах [297, 308]. На величину и положение максимума ППР также влияет форма частицы, показатель преломления среды и температура. В работах [280, 281, 306, 313–317] были показаны изменения показателя преломления среды, необходимые для спектральных изменений ППР в соответствии с предсказаниями теории Ми. Например, растворы додекантиолированных золотых наночастиц среднего диаметра 5,2 нм показывают 8-нм сдвиг ППР при изменении показателя преломления растворителя с $n_d^{20} = 1,33$ до $n_d^{20} = 1,55$. Оболочка лиганда также изменяет показатель преломления и приводит к красному или фиолетовому смещению. При этом экспериментально полученные спектроскопические данные часто отклоняются от предсказания теории Ми, которая имеет дело с безоболочечными наночастицами. Согласие с теорией Ми может быть получено, только когда во внимание приняты изменения, вызванные оболочками лиганда. Эти изменения особенно существенны для тиолированных лигандов, которые проявляют сильное полевое взаимодействие с поверхностным электронным облаком наночастицы. Фактически, постольку все золотые наночастицы нуждаются в стабилизирующих лигандах или полимере, энергия плазменной полосы редко точно совпадает с теорией Ми, если не принимать во внимание изменения, привносимые этими стабилизаторами. У взаимодействующих эллиптических частиц ППР смещен в более длинноволновую область по сравнению с изолированными частицами. Смещение становится незначительным, когда пробел становится большим, чем приблизительно 2,5 длины короткой оси [315]. О красном смещении для поляризации, параллельной длинной оси частицы, и фиолетовом смещении для ортогональной поляризации сообщалось в работе [316].

Оптическая плотность критически зависит от размера частицы и показателя преломления, поскольку показатель преломления золотой наночастицы сильно отличается от такового для оксида или хлорида золота [317].

Другой параметр, существенно влияющий на оптические свойства золотых коллоидов, — заряд ядра частицы. Избыток электронного заряда приводит к более высокоэнергетическому

сдвигу, тогда как электронный дефицит — причина сдвига к более низкой энергии [318]. Удобное теоретическое выражение было получено для положения ППР как функции изменений концентрации свободных электронов:

$$\lambda_{final}/\lambda_{initial} = (N_{initial}/N_{final})^{1/2}. \quad (3.8)$$

Авторы предполагают, что, в золотой наночастице диаметром, например, 5,2 нм, содержащей 2951 атомов Au, на один атом Au приходится один свободный электрон ($N_{initial}=2951$ свободных электронов). Заряд золотой наночастицы +0,82 V против Ag образуется при удалении из нее 19 электронов и, таким образом, N_{final} оказывается на 19 электронов меньше ($N_{final}=2932$). Этому соответствует предсказание красного сдвига 1,7 нм, который является намного меньшим, чем наблюдаемый экспериментально (9 нм от 516 до 525 нм). Последний теоретически соответствовал бы удалению 100 электронов из золотой наночастицы [164]. Причины такого различия не совсем ясны, и предварительные объяснения вовлекают значительный дефицит свободных электронов для большого резонансного сдвига в результате образования оболочки тиолированного лиганда [313–317].

Было найдено, что ширина ППР оказывается минимальной в области диаметров ~25 нм и увеличивается как с уменьшением, так и с увеличением размера наночастиц. Обнаружен также незначительный температурный эффект. Предполагается, что доминирующий механизм электронного смещения включает электрон-электронные, а не электрон-фононные взаимодействия [313]. С другой стороны, фемтосекундное светорассеяние золотыми наночастицами диаметром 80 нм показало, что в индивидуальной золотой наночастице происходят процессы и электрон-фононного и фонон-фононного взаимодействия [314]. В Au/SiO₂ (кор/оболочка) частицах, изменение толщины кремнеземной оболочки и показателя преломления растворителя позволяет контролировать оптические свойства дисперсии в хорошем согласии с теорией Ми [319]. Положение ППР в Au/SiO₂ наночастицах (включая пленки) было точно предсказано моделью Максвелл-Гарнетта, из чего был сделан вывод о

возможности синтеза сложных материалов с оптическими свойствами, промежуточными между прозрачными стеклами и металлическим золотом [320–322].

Для измерения формы линии ППР от отдельных золотых наночастиц использовался эффект оптической антенны ближнего поля, и результаты были сопоставлены с теорией Ми. Были обнаружены двухпиковые формы, вызванные электромагнитным взаимодействием между близлежащими частицами [323].

Максимумы экстинкции ППР в оптических спектрах ориентированных систем золотых наночастиц/полиэтилен для облучающего поля, поляризованного параллельно направлению ориентации, оказались смещенными в красную область относительно максимумов экстинкции для перпендикулярной поляризации ($\lambda_{\max}(0^\circ) > \lambda_{\max}(90^\circ)$). Для палочкообразных частиц абсцисса максимума экстинкции λ_{\max} для падающего поля, поляризованного вдоль длинной оси частицы, оказалась более длинноволновой, чем λ_{\max} для поляризации вдоль ее короткой оси [324]. В работах [325, 326] рассмотрено селективное подавление экстинкции. Была изучена пикосекундная динамика золотых наночастиц, индуцированная лазерным возбуждением, близким к ППР, приводившим к формированию “горячего” (не Ферми) электронного распределения в пределах золотых наночастиц [299, 327]. Сплавление наночастиц, индуцированное видимым лазером, и их фрагментация могли быть вызваны тионикотинамидом, а эффект агрегации исчезал вследствие облучения пульсационным лазером [328]. С помощью спектроскопии временного разрешения было показано, что смягчение режима пульсаций когерентного возбуждения на золотых наночастицах приводит к увеличению периода пульсации с ростом мощности лазерной накачки [329]. Коагуляция (наряду с созреванием Оствальда) золотых наночастиц, диспергированных в органических жидкостях, была существенно ускорена видимым светом. Этот процесс оказался зависимым от длины волны, и ультрафиолетовая радиация приводила к коалесценции [330]. В системах золотых наночастиц с ППР, суспендированных в 2-пропанолe, лазерная радиация приводила к коагуляции или диспергированию частиц в зависимости от их концентрации. Фотохимическая реакция явля-

лась следствием переноса электронов от молекул растворителя к золотым наночастицам [331]. Золотые наночастицы подвергались дигестивному превращению с образованием систем с узким распределением по размерам подходящим выбором лазерной радиации [332]. Когда молекулярный линкер 4-аминобензоилтиол соединял вместе несколько золотых наночастиц, оптическое поглощение изменялось соответственно плазмон-плазмонным взаимодействиям между золотыми наночастицами агрегата [333].

Чувствительность положения пика ППР к различным факторам находит применение для создания оптических сенсоров в биологии. В работах [221, 334] был количественно измерен сдвиг ППР золотых наночастиц при адсорбции на них желатина в зависимости от доли адсорбируемого полимера. Родамин 6G вызывал морфологические изменения системы и рост ППР при лазерной радиации в результате плавления и слияния частиц. Многофотонный процесс, ведущий к слиянию частиц, был объяснен фотолизом в результате вспышки пикосекундного лазера [335]. Увеличение температуры раствора от 10°C до 40°C запускало обратимый гидрофильно-гидрофобный фазовый переход эластиноподобного полипептида — термически чувствительного биополимера, адсорбированного на золотых наночастицах [336].

Формирование больших агрегатов приводило к обратимому изменению цвета суспензии золотых наночастиц с красного на фиолетовый вследствие наложения поверхностных плазмонов в агрегированных коллоидах. ППР использовался для изучения диспергируемости (dispersibility) золотых наночастиц в различных растворителях [337]. Додециламин-покрытые золотые наночастицы, суспендированные в органическом растворителе, при переносе их в воду, содержащую сурфактант ЦТАБ, изменяли цвет суспензии после встряхивания [338]. Поверхностные взаимодействия золотых наночастиц с функциональными органическими молекулами были исследованы с использованием изменений ППР. Например, красное смещение наблюдалось с увеличением диэлектрической проницаемости растворителей, которые не координируют золотое ядро, но ППР не изменялся в полярных, не связывающихся с кором, растворителях [339]. В соответствии с ожиданием, суспензии золотых наночастиц, состоящие

из смеси треугольных/шестиугольных и меньших по размеру сферических частиц показывают два пика ППР при 540 и 680 нм в соответствии с ожиданием. UV-VIS спектры указывают на предпочтительную адсорбцию однородных золотых наночастиц на пленках полиэлектролита и развитие новой полосы 650 нм при увеличении числа двойных слоев [340]. Золотые нанокольца, полученные на подложках из натриевого стекла методом коллоидной литографии, показывали красно-смещенный ППР (по сравнению со сплошными частицами), который может быть настроен по диапазону длин волн изменением соотношения толщины кольца к его радиусу [341].

3.1.1. Экспериментальное исследование поверхностного плазмонного резонанса золотых золей с частицами различных размеров

В 1996 г. в журнале "Оптика и спектроскопия" нами была опубликована работа, посвященная методам оптического контроля приготовления золей золота и их конъюгатов с биоспецифическими макромолекулами [342]. Спектры ослабления света для полидисперсных по размерам и форме частиц золей рассчитывались с использованием теории Ми, метода Т-матриц и различных экспериментальных наборов оптических констант объемного золота, модифицированных с учетом размерных эффектов. Было показано, что модификация объемных констант с помощью двух друдевских вкладов с объемным и размерно-зависимым временем свободного пробега электронов приводит к теоретической зависимости длины волны максимума от размера частиц, отличающейся от наших экспериментальных измерений.

Удовлетворительное согласие с экспериментом было получено при учете размерной поправки только для мнимой части объемной диэлектрической проницаемости. Для различных моделей были рассчитаны спектры ослабления для золей в диапазоне 350–800 нм и сопоставлены с экспериментальными спектрами для синтезированных золей со средним диаметром частиц 5, 10, 24 и 40 нм. Также было показано, что для первых двух раз-

меров наиболее общая модель, включающая полидисперсность размеров и формы, а также размерную зависимость мнимой части диэлектрической проницаемости, дает хорошее согласие с экспериментом (за исключением небольших отличий в величине максимума). Для более крупных частиц (24 и 40 нм) длинноволновая часть экспериментальных спектров была несколько шире теоретической. По результатам электронно-микроскопических и спектральных измерений были получены калибровочные кривые для оперативного спектрофотометрического контроля размера золотых частиц и для определения количества восстановителя, необходимого для получения частиц заданного размера (см. раздел 2.4).

В отличие от оптики концентрированных композиционных сред, содержащих металлические частицы [343–345], поглощение и рассеяние света разбавленными металлическими золями достаточно хорошо описывается в терминах теории свободных электронов Лоренца-Друде и оптических теорий Рэлея и Ми [21, 22, 292, 346–350]. Однако точное количественное описание спектров поглощения (включая положение, величину и ширину пика поглощения вблизи 520 нм и их зависимость от размеров частиц) требует тщательного учета таких факторов, как несферичность и полидисперсность частиц, неоднозначность экспериментальных данных по спектральной зависимости объемных оптических констант, а также модификации этих констант с учетом ограничения длины свободного пробега электронов для ультрадисперсных зольей.

Обычно для частиц 5–50 нм можно использовать рэлеевское приближение для расчета поглощения золя. Тем не менее, измерения показывают, что даже для таких малых частиц имеется заметный сдвиг величины и положения максимума от размера частиц, не согласующийся с рэлеевским приближением. Более того, именно этот небольшой, но надежно регистрируемый сдвиг положения максимума является удобным способом контроля размера частиц в процессе приготовления биоспецифических маркеров на их основе. Для описания этих эффектов необходимо использовать несколько парциальных членов в ряде Ми или точный метод Т-матриц для несферических частиц,

которые обычно также описываются в рамках рэлеевского приближения.

Учет размерной зависимости оптических констант заметно уменьшает величину максимума для наиболее мелких частиц, приводя к существенно лучшему согласию с экспериментом. Мы покажем, однако, что поправка, использовавшаяся в [292, 344] и основанная на добавлении к объемному значению диэлектрической проницаемости двух друдевских вкладов с объемным и модифицированным временем свободного пробега электронов, приводит к зависимости положения максимума от размера частиц, не согласующейся с экспериментом. Более удовлетворительные результаты получаются при модификации только мнимой части диэлектрической проницаемости по аналогии с [22].

При конъюгировании золей со специфическими белками или иными биополимерами экспериментально регистрируется небольшой сдвиг длины волны максимума поглощения и увеличение самого максимума. В первом приближении эти результаты можно интерпретировать в терминах двухслойной модели, обсуждавшейся в [22, 346] (см. также работу [351], специально посвященную расчетам и экспериментальным измерениям поглощения и рассеяния двухслойными и многослойными металлическими частицами).

3.1.2. Оптические константы в зависимости от степени дисперсности золота

Рассчитываемые значения максимума длины волны поглощения очень критичны к выбору спектральной зависимости объемных констант. Из многочисленных опубликованных экспериментальных наборов [352–359] наиболее полным набором оптических констант, включающим область длин волн от рентгеновского до далекого инфракрасного диапазона, являются (насколько нам известно) данные [354]. Отличительной особенностью этих данных является то, что они удовлетворяют соотношениям Крамерса–Кронига. Мы использовали так называемый “второй” набор констант из таблиц [354], который был согла-

сован с данными Конифельда [355] (поэтому данные [355] нами не использовались). Следующий набор оптических констант, использованный нами, был взят из работ Шульца [356], который выполнил также сравнение с более ранними измерениями. В работе [357] приведены очень подробные табличные данные, удовлетворяющие соотношению Крамерса-Кронига, но, к сожалению, охватывающие только часть видимого диапазона. Данные Оттера [353] отличаются от перечисленных выше трех наборов для пленок напыленного золота тем, что они получены для кристаллического золота. В работе [359] был предложен метод определения оптических констант золотых частиц, основанный на измерении поглощения и показателя преломления золей. В дальнейшем для краткости мы будем обозначать различные наборы констант, следуя табл. 3.1.

Таблица 3.1

Оптические константы золота

Набор констант	Источник
$G1$	Hagemann [354]
$G2$	Schultz [356]
$G3$	Irani [357]
$G4$	Otter [353]
$G5$	Römer [359]
$G1-4$	Сплэйн по $G1-G4$

Оптические константы малых частиц с диаметром $d = 2a < 20$ нм могут заметно отличаться от объемных значений вследствие ограничения длины свободного пробега электронов. Более

того, описание взаимодействия электромагнитной волны с металлической наночастицей в рамках классической электродинамики может оказаться неправомерным. В работе [360] на основе S -матричного подхода и техники гриновских функций дано детальное современное изложение квантовой оптики металлических частиц. Для наших целей важным является вывод авторов [360] о том, что для частиц с размером около 10 нм нарушений теории Ми следует ожидать в далеком ИК и СВЧ диапазонах. Таким образом, мы можем, основываясь на результатах работы [360], использовать классические подходы в описании оптических свойств золотых наночастиц.

Влияние размера на оптические константы малых частиц удобно выразить в терминах диэлектрической проницаемости частицы ϵ_a

$$\epsilon_a = \epsilon + \Delta\epsilon(a), \quad (3.9)$$

где ϵ — объемное значение, а поправка $\epsilon(a)$ учитывает вклад ограничения длины свободного пробега электрона (a — радиус частицы). В работах [292, 344] эта поправка записывалась в виде разности двух друдевских членов

$$\Delta\epsilon(a) = \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i/\tau)} - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i/\tau_a)} \quad (3.10)$$

с объемным τ и модифицированным

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_a} + \frac{gV_F}{a} \quad (3.11)$$

временем свободного пробега, учитывающим размер частиц (V_F — скорость электронов на поверхности Ферми, ω_p — плазменная частота, коэффициент пропорциональности g полагался равным 1 в [292, 344], хотя некоторые авторы использовали значение $4/3$ [22]). Обратим внимание, что при использовании поправки в виде (3.10) модифицируются как мнимая, так и реальная части ϵ_a . Если учесть, что для оптических частот $1/\tau_a, 1/\tau \ll \omega$, то поправка $\Delta\epsilon$ становится чисто мнимой [22]:

$$\Delta\epsilon \simeq \frac{ig\omega_p^2 V_F}{a\omega^3}. \quad (3.12)$$

В наших расчетах использовались следующие значения параметров объемного золота [292, 358] $\hbar\omega_p = 8,55$ эВ, $\hbar/\tau_a = 0,108$ эВ, $V_F = 1,39 \times 10^8$ см/сек, при этом поправка (3.12) сводится к

$$\Delta\varepsilon \simeq i\frac{5}{a} \left(\frac{\lambda}{520} \right)^3, \quad (3.13)$$

где радиус частицы и длина волны выражены в нанометрах. Мы рассматривали три варианта введения поправки на размер частиц:

- 1) просто полагая $\Delta\varepsilon = 0$;
- 2) учитывая только изменение мнимой части согласно (3.13);
- 3) проводя расчет $\Delta\varepsilon$ по (3.10).

Далее для краткости эти три модели будем называть моделями 1, 2 и 3, соответственно. При этом соответствующий набор оптических констант будем обозначать $G1(1)$, $G1(2)$ и т.д.

Для расчетов спектров ослабления золей мы интерполировали табличные данные с помощью кубических сплайнов [361]. На рис. 3.1а, 3.1б представлены спектральные зависимости реальной и мнимой частей показателя преломления $n = n' + in''$ (объемные значения) для наборов $G1$ – $G4$. Хотя в целом отличия данных разных авторов невелики, результаты расчета положения максимума поглощения оказываются существенно различными (см. ниже). Спектры ослабления во всем диапазоне 300–800 нм рассчитывались с использованием комбинированного сплайна $G1$ –4, показанного на рис. 3.1 сплошной линией. Этот сплайн построен так, что он в среднем непрерывно описывает фрагменты данных различных авторов, причем в области плазмонного резонанса используется набор $G4$. Показатель преломления дисперсионной среды n_m (вода при 20°C) рассчитывали по формуле [362]

$$n_m = 1,32334 + \frac{3479}{\lambda^2} - \frac{5,111 \times 10^7}{\lambda^4}, \quad (3.14)$$

где длина волны выражена в нанометрах.

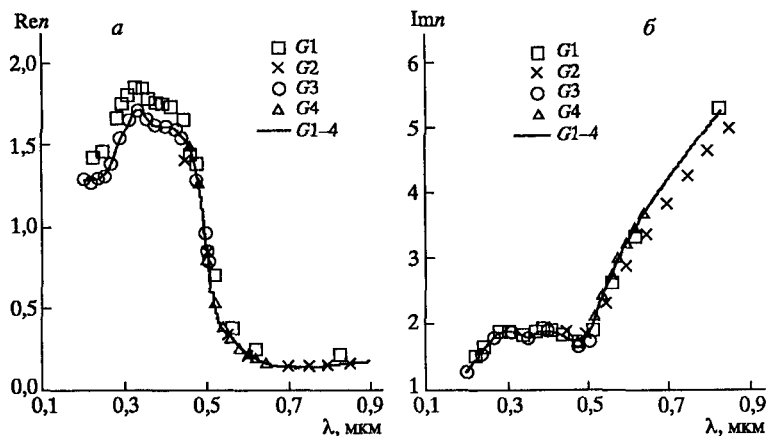


Рис. 3.1. Спектральная зависимость реальной (а) и мнимой (б) частей показателя преломления золота. Точки — экспериментальные данные G1–G4 (см. табл. 3.1), сплошная линия — сплайн G1–4 (пояснения в тексте)

В последнее время в наших расчетах используется комбинированный сплайн для оптических констант золота. Именно, для длин волн 210,4–469,9 нм узлы сплайна взяты из [357]; для диапазона 480–640 нм используются данные [353]; а для диапазона 657,4–1605 нм — данные [363].

3.1.3. Расчет спектров ослабления золей

Показатель ослабления γ (см^{-1}) или оптическая плотность $E = \gamma l \lg e$ (l — толщина слоя) монодисперсного золя сферических частиц золота с весовой концентрацией c_g определяется известным соотношением [22]

$$\gamma = \left(\frac{3c_g}{4\rho_g} \right) \frac{Q_e(\lambda, a, n, n_m)}{a}, \quad (3.15)$$

где ρ_g — плотность золота и $Q_e = Q_a + Q_s$ — фактор эффективности ослабления, обусловленного поглощением и рассеянием.

Для золотых частиц с диаметром 50 нм вклад рассеяния составляет около 15% в области максимума (~ 520 нм) и существенно возрастает для длин волн больше 520 нм. Поэтому мы учитывали рассеяние в расчетах, а в экспериментах апертура приема не превышала 1° , так что малоугловые искажения измеряемых значений оптической плотности были исключены. Естественно, что для более мелких частиц вклад рассеяния существенно снижается.

Факторы эффективности Q_e сферических частиц рассчитывали по теории Ми. Эффекты формы описывали в терминах сфероидальной модели ($a_1, a_2 = a_3$) с радиусом сферы эквивалентного объема a (или диаметром $d = 2a$) и осевым отношением $e = a_1/a_2$. Факторы ослабления и рассеяния сфероидальных частиц, усредненные по ориентациям, рассчитывали по методу Т-матриц, с использованием формул аналитического ориентационного усреднения сечений [364–367]

$$\langle C_a \rangle = \pi a^2 Q_e = \left(\frac{2\pi}{k^2} \right) \text{Re}\{S_p(T)\}, \quad (3.16)$$

$$\langle C_s \rangle = \pi a^2 Q_s = \left(\frac{2\pi}{k^2} \right) |T|^2, \quad (3.17)$$

где $S_p(T)$ означает след Т-матрицы, $|T|^2$ — сумму квадратов ее элементов, $k = 2\pi/\lambda$ есть волновое число. В рэлеевском приближении $Q_e \sim Q_a$ и формула (3.17) сводится к известному результату [22]

$$Q_a = \frac{4\pi a}{9} \text{Im} \left\{ \sum \left[(\varepsilon - 1)^{-1} + L_i \right]^{-1} \right\}, \quad (3.18)$$

где L_i — геометрические факторы деполяризации сфероида. Расчеты по формулам (3.16) или (3.18) предсказывают появление двух резонансных частот для поверхностных плазмонов, соответствующих меньшему и большему размеру частиц. В наших, а также других известных нам экспериментах с золотыми золями, получаемыми по методу Френса [57], это расщепление полосы никогда не наблюдалось, что связано с разбросом частиц по размерам и формам [22]. Анализ микрофотографий для

золей с разным размером частиц показал, что типичные факторы формы частиц в первом приближении можно считать равномерно распределенными между значениями $e = 1$ (сфера) и $e = e_m > 1$. Верхняя граница осевого отношения примерно пропорциональна среднему размеру частиц ($a < 25$ нм)

$$e_m = 1 + \frac{a}{p}, \quad (3.19)$$

где константа p имеет значение порядка 50, если a выражено в нанометрах. Увеличение степени анизотричности частиц с ростом их размера отмечалось также в [21]. Таким образом, кроме усреднения по ориентациям, факторы ослабления или поглощения должны быть усреднены по всем возможным формам. Для расчетов по методу Т-матриц такое усреднение выполнялось численно, а в рэлеевском случае может быть проведено аналитически. Если, например, факторы деполяризации L_i равномерно распределены на интервале $1/3 \pm \delta$, то усреднение рэлеевского сечения поглощения приводит к соотношениям:

$$Q_a = \frac{4\pi a}{9} \text{Im}(J), \quad (3.20)$$

$$J = \frac{1}{6\delta} \left\{ \log \left(\frac{1+x}{1-x} \right) + 4 \log \left(\frac{1+x/2}{1-x/2} \right) \right\}, \quad (3.21)$$

$$x = \frac{3\delta(\varepsilon - 1)}{\varepsilon + 2}. \quad (3.22)$$

Для наших золей более характерным является примерно равномерное распределение по факторам формы с верхней границей (3.19), поэтому уравнение (3.21) сводится к

$$J = \frac{1}{3\delta} \left\{ \log \left(\frac{1}{1-x} \right) + 4 \log \left(1 + \frac{1}{2} \right) \right\}, \quad (3.23)$$

$$\delta = \frac{4}{15} \left(1 - \frac{1}{e_m} \right). \quad (3.24)$$

В формулах (3.21), (3.23) натуральный логарифм комплексного аргумента понимается в смысле главного значения [22].

Показатель ослабления полидисперсного золя дается обычным обобщением формулы (3.15)

$$\gamma = \frac{3c_g \int a^2 Q_e f(a) da}{4\rho_g \langle a^3 \rangle}, \quad (3.25)$$

где $f(a)da$ — числовая концентрация частиц с размером от a до $a + da$. В расчетах использовали симметричное нормальное распределение

$$f(a) \sim \exp \left[-\frac{1}{2} \left\{ \frac{(a - a_m)^2}{\sigma a_m} \right\} \right] \quad (3.26)$$

с модой a_m и нормированной дисперсией a . Значения дисперсии, использовавшиеся в расчетах, составляли 0,1–0,3, а верхняя и нижняя границы размеров определялись утроенным значением a . Обычно распределения частиц, получаемые методами химической конденсации, описываются логнормальным распределением с асимметричным хвостом в области больших размеров [292, 344]. Мы сопоставили результаты расчетов для обоих типов распределений и нашли, что они мало отличаются при значениях дисперсии $a = 0,1$ –0,3.

3.1.4. Зависимость положения и величины максимума ослабления от размера частиц коллоидного золота

Расчеты спектров ослабления как сферических, так и несферических золотых частиц показали, что с увеличением среднего размера и полидисперсности максимум ослабления увеличивается, смещается в красную область и уширяется. В целом такое поведение спектров для золотых золей хорошо известно, поэтому мы перейдем теперь к более детальному обсуждению спектрального положения и величины максимума для различных моделей и сравнению с экспериментом. На рис. 3.2 приведены результаты измерений λ_{\max} для ряда золей с размерами частиц в диапазоне 3,9–41 нм. Данные эксперимента показывают закономерный красный сдвиг положения максимума с увеличением

среднего размера частиц. Характерной особенностью измеренной зависимости является четко выраженный перегиб в области $2a \sim 10$ нм, где величина λ_{\max} резко падает с уменьшением размера частиц.

Сначала мы провели расчеты по теории Ми для простейшей монодисперсной сферической модели, используя пять наборов оптических констант $G1$ – $G5$ и три модели учета размерных эффектов. При использовании объемных значений оптических констант смещение λ_{\max} связано только с размерной зависимостью парциальных вкладов ряда Ми и никаких особенностей при уменьшении размера не обнаруживается (см. кривые с длинными штрихами на рис. 3.2). Очевидно также, что в рэлеевском приближении и при использовании объемных оптических констант вообще не было бы никакого сдвига положения максимума. Таким образом, экспериментальные данные однозначно указывают на необходимость корректировки объемных значений n .

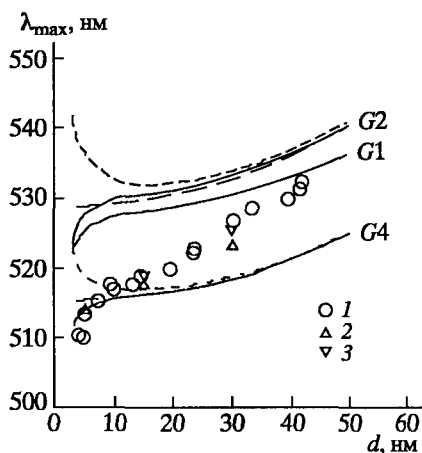


Рис. 3.2. Зависимость длины волны максимума ослабления λ_{\max} от диаметра золотых частиц. Теоретические кривые рассчитаны для монодисперсных сферических частиц с объемными (длинные штрихи) и модифицированными оптическими константами: $G1(2)$ – $G4(2)$, коррекция по уравнению (3.13) — сплошные линии; $G1(3)$ – $G4(3)$, коррекция по уравнению (3.10) — короткие штрихи. 1 — экспериментальные данные, расчет с использованием констант $G5$ по теориям Рэлея (2) и Ми (3)

В работе [359] значения оптических констант золотых частиц вычислялись по данным спектрофотометрических и интерферометрических измерений на основе рэлеевской теории поглощения и формулы типа Максвелла-Гарнетта для эффективного показателя преломления дисперсионной среды. Очевидно, что данная процедура определения оптических констант с учетом размера частиц является самосогласованной в том смысле, что всегда будет давать значения поглощения, близкие к введенным в расчет результатам измерений. На рис. 3.2 мы приводим результаты расчета положения максимума для набора $G5$ (треугольники). Интересно, что вычисления A_{\max} по рэлеевской формуле поглощения, использованной в [359] для расчета n , даже несколько хуже согласуются с нашими измерениями, чем расчет по точной теории Ми. Нам представляется, что метод работы [359] является внутренне противоречивым, поскольку использование рэлеевской формулы для поглощения малых частиц связывает весь эффект сдвига максимума только с размерной зависимостью n , что верно лишь для частиц с диаметром меньше 8–10 нм. Тем не менее, отличное согласие наших данных с расчетом, в котором были использованы оптические константы [359] для трех размеров частиц, свидетельствует об очень близком совпадении наших ЭМ и спектральных измерений с измерениями Рёмера и Фрагштейна [359].

Учет размерных эффектов, согласно уравнениям (3.9)–(3.11), приводит к зависимости $\lambda_{\max}(d)$, прямо противоположной экспериментальной (см. кривые с короткими штрихами на рис. 3.2 в области малых размеров). Это означает, что в области размеров частиц меньше 10 нм использование объемных констант или модифицированных по формулам (3.9)–(3.11) не согласуется с экспериментальными измерениями зависимости положения максимума экстинкции от размера частиц. Наконец, для второй модели размерных поправок, когда учитывалась модификация только мнимой части ϵ согласно (3.12), мы получили качественное согласие с экспериментом для всех наборов оптических констант $G1$ – $G4$ (сплошные кривые на рис. 3.2). Однако для наборов $G1$ – $G3$ все теоретические кривые лежали существенно выше экспериментальных. Поскольку результаты расчетов для слу-

чаев $G1-G3$ во многом аналогичны, мы привели все три кривые только для набора $G2$ и одну из кривых для набора $G1(2)$. Наиболее близкие к экспериментальной зависимости теоретические кривые были получены только для набора Оттера $G4(2)$, однако теоретический сдвиг максимума все же был заметно меньше экспериментального.

В следующей серии расчетов (рис. 3.3) учитывались распределения частиц по размерам и аксиальным отношениям, как описано выше. Для модели несферических эквиобъемных частиц (короткие штрихи на рис. 3.3) сдвиг "сферической" теоретической кривой приводит к лучшему, но далеко не полному согласию с экспериментом. Наконец, учет обоих типов полидисперсности (длинные штрихи) дает вполне удовлетворительное согласие с измеренной зависимостью.

Результаты измерений величины максимума экстинкции в зависимости от размера частиц золя при фиксированной концентрации 57 мкг/мл и толщине слоя 10 мм показаны на рис. 3.4 вместе с расчетами для монодисперсных сфер (сплошные кривые 1-3), моно- и полидисперсных сфероидов с распределением по факторам формы (штриховые кривые 4-6). Учитывая результаты расчета спектрального положения максимума, мы приводим в основном данные для набора $G4(2)$. Отметим, однако, что для величины максимума лучшее согласие с экспериментом получается для набора $G1(2)$. Для сферических частиц с объемными оптическими константами значения максимумов оказываются существенно выше экспериментальных (кривая 1) и вид зависимости $E_{\max}(d)$ отличается от экспериментальной. Введение поправки на размер в мнимую часть ϵ , согласно уравнению (4.13), заметно улучшает согласие результатов расчетов и измерений (см. кривые 5 и 2 для наборов $G1(2)$ и $G4(2)$ соответственно). Зависимость $E_{\max}(d)$ эквиобъемных сфероидов с распределением по факторам формы (кривая 4 для набора $G4(2)$) имеет более пологий вид и несколько лучше соответствует экспериментальной, чем кривые для сфер. Однако, в отличие от данных рис. 3.3, учет полидисперсности не приводит к лучшему согласию с экспериментом, в особенности для значения $\sigma = 0,3$ (кривая 6).

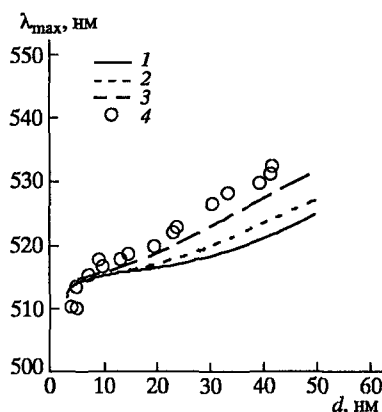


Рис. 3.3. Зависимость длины волны максимума ослабления λ_{\max} от среднего размера d золотых частиц. Теоретические кривые рассчитаны для монодисперсных сферических частиц (1), сфероидов с распределением только по факторам формы (2) и с распределениями по размерам и факторам формы (3, $\sigma = 0, 3$). Использованы оптические константы $G4(2)$ (коррекция по уравнению (3.13)), 4 — экспериментальные данные

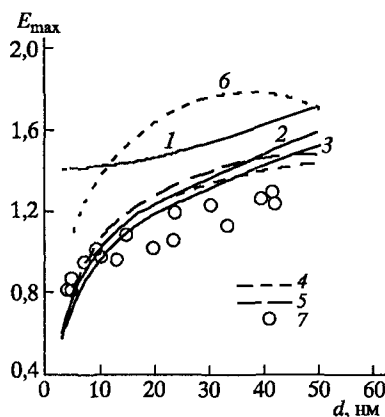


Рис. 3.4. Зависимость величины максимума ослабления от среднего размера d частиц. Расчет для монодисперсных сферических частиц (1-3), сфероидов с распределением только по факторам формы (4) и с распределениями по размерам и факторам формы (5, 6, $\sigma = 0, 1$ и $0,3$ соответственно). Использованы оптические константы $G4(1)$ — 1, $G4(2)$ — 2, 4, 5, 6 и $G1(2)$ — 3. 7 — экспериментальные данные

Наши эксперименты показали, что значения максимума экстинкции для золей разного приготовления воспроизводятся заметно хуже, чем значения λ_{\max} . Это видно и по различиям в разбросах экспериментальных точек на рис. 3.3 и 3.4. Поэтому вместо определения размера частиц золя на основе измерений абсолютной величины экстинкции (или отношения для двух длин волн) [349, 368] предпочтительнее измерять спектральное положение максимума. На рис. 2.3 мы приводили калибровочную кривую для быстрого и достаточно точного определения среднего размера частиц золя, основанную на наилучшей сглаженной полиномиальной аппроксимации спектрофотометрических и ЭМ данных. Подчеркнем, что, кроме чисто прикладного назначения, эта зависимость была теоретически обоснована данными, приведенными на рис. 3.3.

На рис. 3.5а–3.5г приведены экспериментальные и теоретические спектры ослабления золей с диаметром частиц 5, 10, 24 и 40 нм. Для наглядности непрерывные экспериментальные спектры показаны кружками. Расчеты выполнены для полидисперсных сфероидов ($\sigma = 0,1$ и $0,3$), причем для фракции каждого размера аксиальное отношение предполагалось равномерно распределенным в диапазоне $1 < e < e_m$ с верхней границей (3.19). Оптические константы вычислялись по сплайну (рис. 3.1), причем в области плазмонного резонанса сплайн был построен по набору G4. Мнимая часть ϵ поправлялась на размер частиц согласно (3.13). Экспериментальные спектры частиц с $d = 5$ и 10 нм лучше описываются теоретическими кривыми для более широкого распределения по размерам, за исключением области максимума. Величины максимумов лучше соответствуют кривым, рассчитанным для $\sigma = 0,1$. Для частиц с диаметром 24 нм вид экспериментального спектра лучше описывается кривой с $\sigma = 0,1$, однако его длинноволновая часть явно уширена по сравнению с теоретической. Это уширение еще сильнее выражено для спектра золя с размером частиц 40 нм.

Анализ результатов расчета для различных моделей показал, что более точного совпадения измеренных и рассчитанных спектров можно было бы добиться, используя подгоночные параметры в моделях оптических констант. Например, в работе

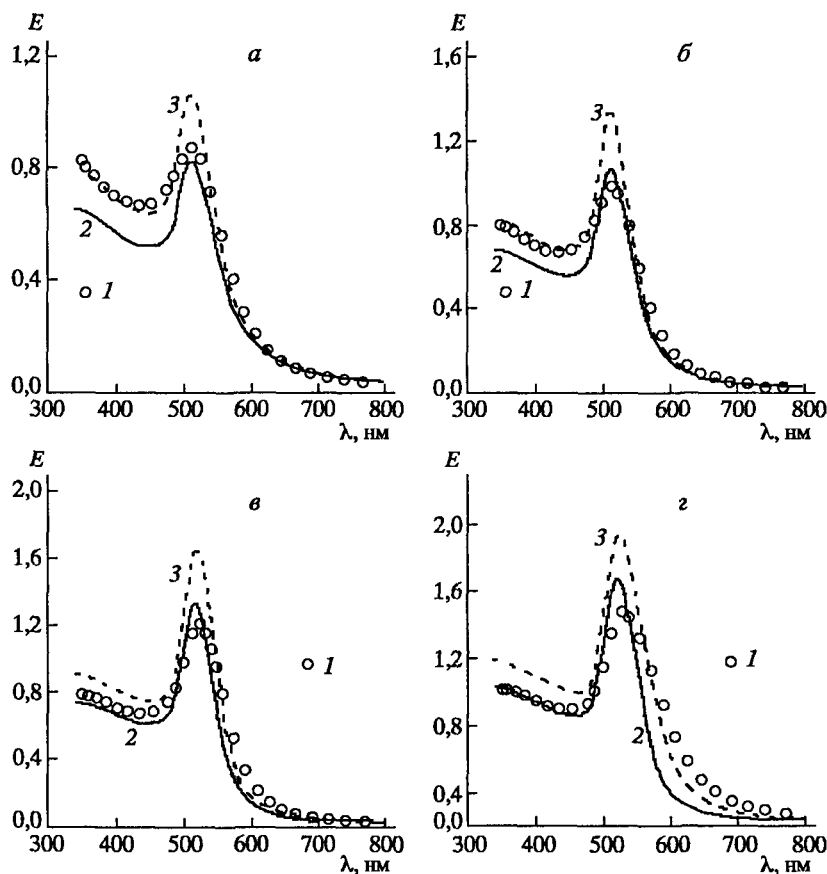


Рис. 3.5. Экспериментальные (1) и теоретические спектры ослабления золь с концентрацией золота 57 мкг/мл (толщина слоя 10 нм) и средним размером частиц 5 (*a*), 10 (*б*), 24 (*в*) и 40 (*г*) нм. Расчет для сфероидов с распределением по размерам и факторам формы частиц. Параметр полидисперсности $\sigma = 0,1$ (2), 0,3 (3), оптические константы — сплайн G1-4

[292] в качестве такого параметра использовалось значение плазменной частоты для частиц, отличающееся от ее объемного значения. Это возможное отличие физически мотивировалось авторами [292] как результат диполь-дипольного взаимодействия кластеризованных частиц золота, напыленных на стеклянную

подложку. В случае разбавленных золей с изолированными частицами этот подход, очевидно, непригоден. В работе [350] также использовалось два подгоночных параметра, связанных с дефектами решетки внутри серебряных частиц и с поверхностными примесями. Мы не располагали более или менее надежными данными об этих параметрах для наших золей, поэтому использовали только объемные константы, модифицированные с учетом ограничения длины свободного пробега электронов. Единственными варьируемыми параметрами в наших расчетах были степени полидисперсности по размерам и осевому отношению, однако, эти параметры подбирались на основе электронно-микроскопических измерений. Таким образом, учитывая минимальное количество подгоночных параметров, можно признать, что использованные теоретические модели позволяют достаточно точно описать спектральное положение максимума, его зависимость от размера частиц и общий вид спектров ослабления в диапазоне 350–800 нм.

3.2. Резонансное светорассеяние

Об изменениях цвета золотых золей в зависимости от размеров частиц известно с конца 19-го — начала 20-го века из трудов Фарадея и Жигмонди [12, 13]. В принципе, все исследователи, которые занимались размерной зависимостью оптических свойств золотых золей, отмечали, что у золей с размерами частиц более 50 нм проявляется заметная опалесценция (эффект Тиндалля), чаще всего характеризуемая, как бурая. Цвет рассеянного света становится заметным при освещении тонким пучком интенсивного белого света и зависит от размеров частиц [303]. В отличие от оптически мягких рэлеевских частиц, рассеяние суспензиями благородных металлов — золота, серебра, меди носит ярко выраженный резонансный характер.

Одно из первых сообщений об измерении положения максимумов светорассеяния металлическими наночастицами (серебряными, медными или золотыми) датируется 1977 г. [369]. Для серебряных частиц со средними размерами от 2 до 150 нм, опре-

деленными методом ТЭМ, было установлено положение пика светорассеяния при 367 ± 5 нм ($3,80 \pm 0,06$ эВ). Объяснение резонансного светорассеяния авторы [369] нашли в коллективных колебаниях электронов проводимости. Анализ резонанса рассеянного света серебряных частиц был сделан с использованием данных о гранулометрическом составе и точных вычислений рассеивания от сфер. Значительные различия между вычислениями и наблюдаемыми спектрами указывают, что на ширину резонанса влияют несферические формы частиц, так же как столкновения электронов проводимости с поверхностью металла. Можно заметить также, что использованная авторами [369] аппаратура не позволяла зафиксировать максимумы светорассеяния от золотых и, тем более, медных наночастиц, лежащие, как мы увидим далее, в более длинноволновой области (выше 500 нм — предел в данных экспериментах).

Теоретическая зависимость величины и положения максимумов экстинкции и рассеяния света от размера сферических металлических частиц дается теорией Ми [6], однако, между экспериментальными спектрами и расчетами по теории Ми всегда имеются хотя и малые, но все же не пренебрежимые различия [22]. Лучшего согласия между расчетными и измеренными спектрами можно добиться, учитывая размерную зависимость оптических констант золотых наночастиц, а также их полидисперсность и полиморфность [307, 342].

Теория Ми, в классическом виде описывающая только сферические поглощающие частицы, нашла свое развитие в работах Керкера [346], ван де Хюлста [303], Борена и Хафмена [22] и была обобщена для частиц произвольной формы и сфер оболочечной структуры. Современному состоянию теории светорассеяния и его практическому применению для характеристики корпускулярных объектов посвящена работа Джонса [370]. Однако, длительное время основное внимание исследователей было посвящено, главным образом, изучению поглощения, что связано с особенностями техники измерений. Действительно, стандартные спектрофотометры, нефелометры и спектрофлуориметры оказались малоприспособленными для измерений светорассеяния абсорбирующих взвесей вследствие того, что спектры поглощения

и рассеяния света золями серебра и золота в значительной степени перекрываются.

Прогресс в этой области был достигнут после опубликования работ Жуана и Евангелины Игюирабайд [148, 371] и связан, главным образом, с развитием техники цифровой записи и обработки микроизображений. Несмотря на общую природу поглощения и рассеяния света металлическими частицами, а именно, возникновение плазмонных волн вследствие поляризуемости, характеристика светорассеяния имеет свои отличительные особенности. К ним следует отнести сложную угловую зависимость интенсивности упруго рассеянного света (индикатрисы), а также особенности взаимодействия с поляризованным светом (деполяризацию) [372].

В работе [373] спектроскопия резонансного светорассеяния (РСР) была использована для изучения взаимодействия тиолсодержащего фармацевтического тиамазола с КЗ. Было отмечено, что при рН 5,2 пик спектра РСР спектра находился при 555 нм и интенсивность его менялась симбатно количеству добавляемого тиамазола вследствие лиганд-индуцируемой агрегации КЗ, наблюдаемой также при помощи ТЭМ.

В работе [374] РСР, называемое авторами рэлеевским резонансом, в совокупности с данными поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS), а также ТЭМ и темнопольной световой микроскопии предложено использовать для диагностики *in vitro* вируса мозаики костра (*brome mosaic virus*), декорируемого изнутри капсида (28 нм) частицами КЗ (2,5–4,5 нм). Оптические изменения в спектрах РСР объясняются парным взаимодействием частиц КЗ, заключенных в диссоциирующие и реассоциирующие вирусные частицы. При сближении частиц КЗ спектр РСР становится двухмодовым в отличие от одномодового, когда частицы находятся на значительных расстояниях друг от друга.

В работе [375] отмечается, что формирование агрегатов частиц произвольного размера и формы сосредоточением малых частиц приводит к экстинкции и рассеянию света, отличным от таковых для изолированных частиц. Процесс агрегации может сопровождаться изменением спектров экстинкции и угловой за-

зависимости рассеяния света. Введение новых параметров в схему измерения углового светорассеяния позволило эффективно отличать системы, содержащие только изолированные кластеры, от систем агрегированных кластеров. Это было достигнуто оценкой результатов измерений света, рассеянного прямо вперед, назад и под углом 90° , приводившей к отличному разрешению систем изолированных кластеров от агрегированных систем. Для измерения углового светорассеяния света системами коллоидных частиц благородных металлов обычная установка фотогониометра была изменена. Изменения параметров светорассеяния и экстинкции были качественно описаны моделью, которая принимает во внимание электромагнитное взаимодействие между металлическими кластерами в агрегате.

Заметным светорассеянием обладают также нанокольца [341]. Оптический ответ дискообразных и кольцеобразных золотых частиц изучался по результатам определения их сечения поглощения и рассеяния в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне. Для частиц ~ 120 нм обнаружена строгая зависимость мод поглощения от фактических размеров частиц. В работе показаны как экспериментальные результаты, так и данные численного моделирования оптических свойств частиц в зависимости от их геометрии. Нанокольца показали также усиление резонансной спонтанной эмиссии, сфокусированной прямо вдоль оси частицы.

В работе [376] показано, что золотые и серебряные коллоиды имеют сильные цвета в результате электронных колебаний, индуцированных падающим светом, которые упоминаются как плазмонное поглощение. В этой работе описывается новый подход к разработке оптических датчиков, использующих светорассеивающие свойства наночастиц. Коллоидная агрегация была индуцирована авидин-биотиновым взаимодействием, которое сдвигало плазмонное поглощение в длинноволновую область. Авторы полагают, что этот сдвиг является следствием изменения светорассеяния при различных длинах волн падающего света. При проведении измерений отношения интенсивностей светорассеяния при двух длинах волн облучающего света, эти измерения становятся независимыми от общей концентра-

ции коллоидной фазы. Высокая эффективность рассеяния этими коллоидами была равнозначной интенсивности флуоресценции, нормализованной на оптическую плотность флуорофора и коллоида. Этот подход может быть использован в широком разнообразии методов приборного анализа, включая методы, обычно используемые для обнаружения флуоресценции.

В работе [377], посвященной разработке визуально реализуемого генодиагностического метода твердофазного анализа вирусов гепатита В и С с использованием олигонуклеотид-тиол-золотых наночастиц (основанного на технике сэндвич-гибридизации — наноамплификации) и серебряного усиления, РСР использовали для оценки и мониторинга иммобилизации генных зондов на золотых наночастицах. Регистрацию РСР проводили с помощью спектрофлуориметра в режиме синхронизации возбуждения и приема ($\Delta\lambda=0$).

В работе китайских ученых, опубликованной в 2001 г., спектроскопия резонансного рассеяния золотых наночастиц интерпретируется в терминах супермолекулярных межуровневых энергетических переходов [378]. Золотые наночастицы были синтезированы по методу Френса с диаметрами от 10 до 95 нм. Каждый из золей показывал пик резонансного рассеяния при 580 нм. Механизм резонансного рассеяния для золотых наночастиц был объяснен согласно теории волнового движения наночастиц в жидкости. Принцип супермолекулярных межуровневых энергетических переходов был выдвинут и применен для объяснения взаимосвязи между диаметром и цветом золотых наночастиц в жидкости. Новый способ спектрофотометрического определения диаметра частиц предложен на основании взаимосвязи диаметров частиц со спектральными положениями максимумов абсорбции [378].

Кроме того, отметим еще одну работу китайских ученых, отличающуюся аналитической точностью и обстоятельностью. В ней [379] приводится метод количественного определения белков в растворах, основанный на резонансном светорассеянии коллоидным хлористым серебром. Чувствительность метода составляла 8 нг/мл с линейным диапазоном от 10 до 400 нг/мл белка в пробе.

В работе [380] мы привели первые экспериментальные данные по измерениям спектров света, рассеянного под углом 90° частицами КЗ (диаметр 30 нм) и кластерами из этих частиц, образованными в процессе агрегации при добавлении соли (NaCl). Необходимо отметить, что приведенные в работе [380] спектры рассеяния были фактически суперпозицией истинных спектров углового упругого рассеяния и экстинкции, которые имели существенно перекрывающиеся спектральные полосы. Обычно нефелометрические измерения в поглощающих системах проводят в окнах прозрачности, однако для измерений спектров упругого рассеяния в представительной полосе длин волн (например, 300–800 нм) такой подход часто непригоден.

В наших работах [218, 308] мы провели сравнение двух методов определения среднего размера наночастиц золота, основанных на измерении длин волн максимумов бокового рассеяния и экстинкции в области 400–700 нм. Экспериментально исследовались золи со средними диаметрами частиц около 15, 30, 45, 60 и 90 нм [308] и 15, 20, 25 и 30 нм [218], измеренными методом ДРС. При этом выяснилось, что угловой наклон размерной зависимости спектрального положения максимума рассеяния в 2,4 раза превышает таковой для экстинкции, что обеспечивает существенно большую точность первого метода. Для моделирования полидисперсности мы использовали смеси трех коллоидов с диаметром частиц 20, 25 и 30 нм: образец S1, близкий к нормальному распределению около 25 нм, и образец S2 с одинаковым количеством частиц каждого компонента в единице объема. Спектры экстинкции смесей S1, S2 и исходного 25-нм золя (S0) практически не отличались, в то время как спектры рассеяния имели четкое различие с ростом максимума в ряду S0, S1, S2. Эти результаты согласуются с расчетами по теории Ми. Таким образом, спектры рассеяния имеют преимущество перед спектрами экстинкции не только в определении среднего размера наночастиц золота, но и в оценке их полидисперсности [381].

Для измерений спектров рассеяния использовалась стандартная приставка для флуоресцентных измерений к спектрофотометру "Specord M40". Приставка позволяет освещать кювету с измеряемым образцом под прямым углом по отношению к

фотоприемнику, который регистрирует флуоресценцию в некотором телесном угле, ориентированном перпендикулярно падающему свету. В принципе, эта схема пригодна и для измерений спектров рассеяния. Однако в качестве сигнала сравнения в стандартной приставке используется специальный флуоресцирующий эталон, который является спектрально зависимым. Поэтому мы внесли небольшую модификацию в приставку, заменив стандартный эталон на диффузно отражающий и спектрально нейтральный рассеиватель.

На рис. 3.6 изображена схема работы двухлучевого спектрофотометра в режимах регистрации экстинкции или рассеяния. Свет от источника после прохождения монохроматора (1) разделяется на измерительный пучок (2) и пучок сравнения (3) и через систему зеркал (4, 5) и диффузных отражателей (6, 7) попадает на фотоэлектронный умножитель (8). В режиме регистрации экстинкции в измерительный пучок (2) устанавливается кювета (9а) с образцом, а в пучок сравнения — кювета (9б) с соответствующим буфером. В случае измерения спектров рассеяния $I_{90}(\lambda)$ стандартная четырехсторонняя кювета 1×1 см с образцом (10) устанавливается в измерительный канал вместо диффузного отражателя (6). Для компенсации искажающего действия полосы поглощения на регистрируемый спектр светорассеяния кювету с образцом (9а) устанавливали также и в канал сравнения (3). Регистрируемый таким способом спектр мы назвали дифференциальным спектром светорассеяния (ДССР). При проведении кинетических измерений исследуемую систему (например, смесь КЗ маркера с комплементарным компонентом) делили на равные объемы по 2 мл и разливали в кюветы, после чего сразу же производили последовательные циклические измерения экстинкции и рассеяния.

Для первичной апробации метода ДССР, реализуемого на модифицированной приставке (рис. 3.6), было выполнено два экспериментальных теста. Во-первых, результаты измерений спектров экстинкции и рассеяния для золей с известным средним размером частиц были сравнены с расчетами по теории Ми [6]. Во-вторых, была проверена выполнимость условий однократного рассеяния для тех концентраций наночастиц, которые

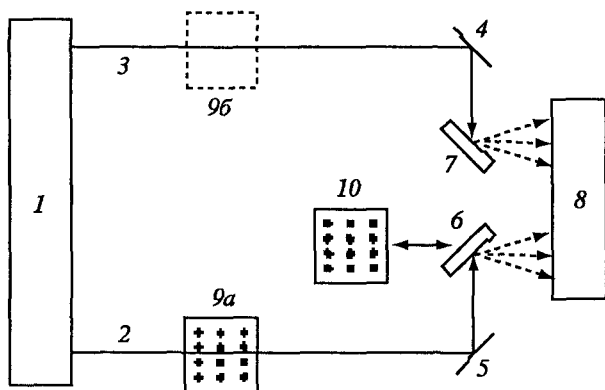


Рис. 3.6. Схема работы спектрофотометра в режиме измерения экстинкции и бокового светорассеяния. 1 — двухлучевой монохроматор, 2, 3 — измерительный пучок и пучок сравнения, 4, 5 — зеркала, 6, 7 — диффузные рассеиватели, 8 — фотоэлектронный умножитель, 9 и 10 — измерительные кюветы. Пояснения в тексте

реально используются в экспериментах по изучению биоспецифических взаимодействий. Для этих целей были синтезированы золи золота в диапазоне размеров золотых частиц 15–90 нм с постоянной весовой концентрацией золота 0,0057% ($2,85 \times 10^{-4}$ М). Рис. 3.7 показывает экспериментальные и теоретические зависимости спектральных положений максимумов экстинкции $\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ и рассеяния $\lambda_{\max}^{\text{sc}}$ от среднего диаметра d наночастиц КЗ. В целом, полученные красные смещения пиков экстинкции находятся в согласии с другими многочисленными измерениями и расчетами по теории Ми [22, 148, 307]. Отметим, что экспериментальные пики резонансного светорассеяния (светлые точки) имеют более выраженное красное смещение, чем пики экстинкции (темные точки). Сплошная линия на рис. 3.7 показывает положение пиков экстинкции, рассчитанных по теории Ми с использованием комплексного показателя преломления золота $n(\lambda)$, определяемого по сплайну G1-4 и скорректированного на эффект ограничения свободного пробега электронов. Результаты расчета $\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ и $\lambda_{\max}^{\text{sc}}$ качественно объясняют экспериментальный длинноволновый сдвиг экстинкции и резонансного рассеяния с увеличением размера частиц, однако более или менее удовлетворительное

количественное согласие имеется только для случая экстинкции. В случае рассеяния, измеренные и рассчитанные значения $\lambda_{\max}^{\text{sc}}$ отличаются значительно. Возможно, лучшего согласия можно было бы добиться за счет усложнения теоретической модели, учитывая полидисперсность и несферичность частиц КЗ. Однако нас интересовали, в первую очередь, принципиальные возможности дифференциальной спектроскопии рассеяния в применении к исследованию биоспецифических взаимодействий.

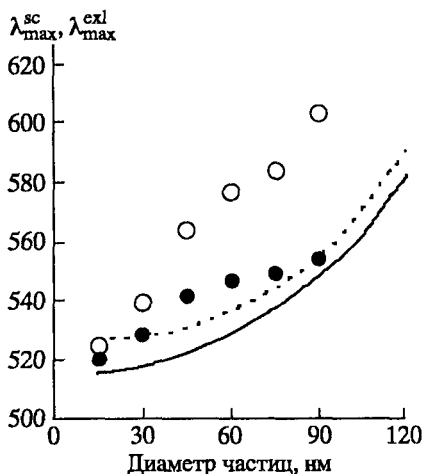


Рис. 3.7. Экспериментальные и теоретические зависимости спектральных положений максимумов рассеяния ($\lambda_{\max}^{\text{sc}}$, светлые точки) экстинкции ($\lambda_{\max}^{\text{ext}}$, темные точки) от размера частиц КЗ. Расчет спектральных максимумов по теории Ми показан сплошной линией для экстинкции и штриховой для рассеяния

На рис. 3.8 приведены экспериментальные и теоретические значения плазмонных резонансов экстинкции $E_{\max} \equiv E(\lambda_{\max}^{\text{ext}})$ (рис. 3.8а) и светорассеяния $I_{90, \max} \equiv I_{90}(\lambda_{\max}^{\text{sc}})$ (рис. 3.8б) в зависимости от размеров частиц. При фиксированной концентрации золота максимальное значение экспериментального плазмонного резонанса экстинкции достигается для частиц с диаметром около 60 нм.

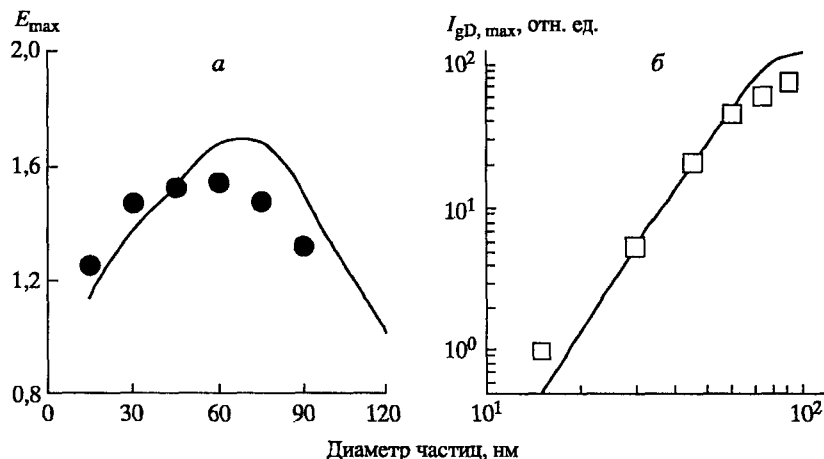


Рис. 3.8. Экспериментальные (точки) и теоретические зависимости максимумов экстинкции (а) и интенсивности рассеяния (б) от диаметра частиц КЗ

Теоретическая кривая на рис. 3.8а рассчитана по формуле

$$E_{\max}(d) = \ln \left(\frac{3c_g l}{2\rho_g} \right) \frac{Q_e(\lambda_{\max}, d, m)}{d}, \quad (3.27)$$

где c_g — концентрация золота, ρ_g — плотность золота, l — толщина слоя (кюветы), $Q_e(\lambda, d, m)$ — коэффициент экстинкции сферических золотых частиц с диаметром d и комплексным относительным показателем преломления $m = n(\lambda)/n_0(\lambda)$ [307], $n_0(\lambda)$ — показатель преломления буфера (воды) [307]. Из рис. 3.8а видно, что теоретическая кривая воспроизводит экспериментальные данные, но смещена в красную область примерно на 5–10 нм и достигает максимума в области диаметров частиц около 70 нм в хорошем согласии с экспериментальным результатом $d_{\max}^{\text{ext}} \approx 60$ нм. Что касается абсолютных величин E_{\max} , то обычно значения, рассчитанные по теории Ми, лежат выше экспериментальных и очень чувствительны к выбору спектральной зависимости объемных оптических констант золота, а также к полидисперсности по размерам и форме частиц, как было показано в предыдущем разделе. В данном случае абсолютные значения измеренных и рассчитанных максимумов отличаются на 5–10%.

Мы не проводили калибровку приставки (рис. 3.6) для измерения абсолютных значений интенсивности. Поэтому данные для резонансного рассеяния $I_{90,\max}$ представлены в относительных единицах (рис. 3.8б). Для сопоставления теоретических расчетов с результатами измерений использовалась следующая нормировка. Пусть I_1 есть интенсивность рассеяния одной частицей

$$I_1 = I_0 \frac{S_{11}(\theta)}{k^2 r^2}, \quad (3.28)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, S_{11} — первый элемент матрицы Мюллера [22], пропорциональный теоретической интенсивности рассеяния неполяризованного света, $k = 2\pi n_0/\lambda$ — волновое число в дисперсионной среде, r — расстояние от частицы до фотоприемника. Полная интенсивность рассеяния от всего регистрируемого рассеивающего объема золя V_{sc} пропорциональна $I_1 v$, где $N = c_g/V_1 \rho_g$ — числовая концентрация частиц с объемом V_1 . Таким образом, регистрируемый сигнал резонансного рассеяния под углом 90° на длине волны λ_{\max}^{sc} будет равен

$$\begin{aligned} I_{90,\max} &= I_1(\theta = 90, \lambda_{\max}) V_{sc} c_g / V_1 \rho_g = \\ &= A I_0 \frac{16 S_{11}(\theta = 90, \lambda_{\max}^{sc})}{3x^2 d}, \end{aligned} \quad (3.29)$$

где A — множитель, зависящий от концентрации взвеси, геометрии рассеяния и свойств фотоприемника, $x = ka$ — параметр размера частиц с радиусом $a = d/2$. Нормировка первого элемента матрицы Мюллера в уравнении (3.28) соответствует равенству

$$\frac{16 S_{11}(\theta = 90)}{3x^2} = C_{sc}(x, m) / \pi a^2 = Q_{sc}(x, m), \quad (3.30)$$

справедливому для рэлеевских частиц, C_{sc} — сечение рассеяния, Q_{sc} — безразмерный коэффициент рассеяния. Мы выбрали множитель нормировки A в уравнении (3.29) из условия совпадения измеренных и рассчитанных резонансных интенсивностей

для частиц с диаметром 30 нм

$$A = I_{90,\max}^{\text{exper}} / I_{90,\max}^{\text{theory}}, \quad d = 30 \text{ нм.} \quad (3.31)$$

Величина теоретической резонансной интенсивности в диапазоне размеров от $10 \leq d \leq 60$ нм изменяется как $I_{90,\max} \sim d^{3,35}$. Показатель степени, близкий к 3, объясняется известными закономерностями дипольного рэлеевского рассеяния [22]. Напомним, что для малых рэлеевских частиц рассеянное поле пропорционально дипольному моменту, который пропорционален объему одной частицы V_1 . Следовательно, интенсивность рассеяния от одной частицы $I_1 \sim V_1^2 \sim d^6$ и, в соответствии с уравнением (3.29), полная интенсивность рассеяния $I_{90,\max} \sim d^3$. Отличие показателя 3,35 от точного значения 3 связано со спектральной зависимостью поглощения для разных $\lambda_{\max}^{\text{sc}}$ и с тем, что в наших расчетах учитывалась зависимость показателя преломления наночастиц от их размера ("размерный эффект" [307]). Если использовать объемные константы золота (сплайн G1-4), то расчет по теории Ми в диапазоне $10 \leq d \leq 60$ нм для зависящих от размера $\lambda = \lambda_{\max}^{\text{sc}}(d)$ дает $I_{90,\max} \sim d^{3,12}$, а для $\lambda = \text{const} = 520$ нм $I_{90,\max} \sim d^{2,97}$. При $d > 60$ нм наблюдается отклонение от кубической зависимости, которое объясняется нарушением условий дипольного рассеяния за счет вклада высших мультиполей. Несколько заниженные, по сравнению с расчетом, экспериментальные значения интенсивности резонансного рассеяния в области $d > 60$ нм могут быть связаны с рядом факторов (полидисперсность и несферичность частиц золя, неполное восстановление и т.д.). В целом, сравнивая измеренные и рассчитанные зависимости $\lambda_{\max}^{\text{ext}}$, $\lambda_{\max}^{\text{sc}}$, E_{\max} и $I_{90,\max}$ от диаметра частиц, мы полагаем, что наша методика измерения рассеяния для образцов с перекрывающейся полосой поглощения дает приемлемые результаты для спектров рассеяния.

Следует подчеркнуть, что, в отличие от спектров экстинкции, спектры упругого рассеяния сильно зависят от условий измерения (геометрия рассеяния и фотоприема, вклад рассеяния высших кратностей, искажения за счет поглощения и т.п.) и могут заметно отличаться от "истинных" спектров однократ-

ного рассеяния. Для того чтобы убедиться в адекватности наших измерений режиму однократности рассеяния, мы измерили спектры поглощения и дифференциального светорассеяния для различных концентраций дисперсной фазы. На рис. 3.9а приведены спектры экстинкции и рассеяния для золя с диаметром частиц 30 нм в серии последовательных разведений в пропорции 1:1,25:1,5:1,75:2. Из рисунка видно, что положение спектральных максимумов практически не изменяется, что является одним из основных критериев однократности рассеяния.

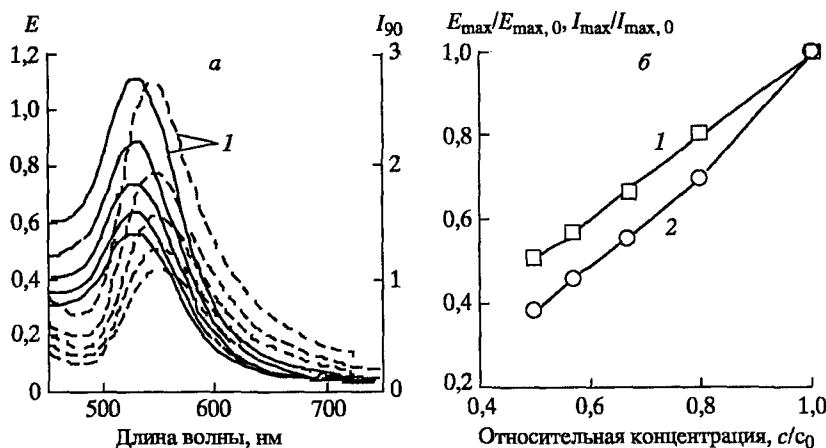


Рис. 3.9. а — экспериментальные спектры экстинкции (сплошные линии) и светорассеяния (штриховые линии), полученные для частиц КЗ с диаметром 30 нм при разведении исходного золя (кривые 1) в пропорции 1:1,25:1,5:1,75:2 (сверху вниз). б — зависимость максимумов экстинкции (1) и светорассеяния (2) от концентрации золя (все величины нормированы к параметрам исходного золя)

На рис. 3.9б показана примерно линейная зависимость резонансных значений экстинкции E_{\max} и дифференциального резонансного светорассеяния $I_{90,\max}$ от относительной концентрации дисперсной фазы, что позволяет сделать заключение о выполнении условий однократного режима рассеяния. Отметим, что данные рис. 3.9б были нормированы на значения экстинкции и светорассеяния исходного неразведенного золя.

При калибровке спектрофотометра с диффузными отражателями, в память прибора записываются значения калибровочных пропусканий $T_0(\lambda)$ для 100% -ой линии на 128 длинах волн

$$T_0(\lambda) = \frac{I_1(\lambda)r_1(\lambda)}{I_2(\lambda)r_2(\lambda)}, \quad (3.32)$$

где $I_{1,2}(\lambda)$ — интенсивности эталонного и измерительного пучков на выходе монохроматора, $r_{1,2}(\lambda)$ — коэффициенты отражения для эталонного и измерительного отражателей. В режиме измерения экстинкции измеряемый сигнал после автоматического деления на калибровочные множители $T_0(\lambda)$ равен пропусканию золя

$$T_E(\lambda) = \frac{I_1(\lambda)r_1(\lambda)T_b(\lambda)10^{-E(\lambda)}}{I_2(\lambda)r_2(\lambda)T_b(\lambda)T_0(\lambda)} = 10^{-E(\lambda)}, \quad (3.33)$$

где T_b — пропускание кюветы с буфером (предполагаются одинаковыми в обоих каналах), E — измеряемая экстинкция золя за вычетом экстинкции буфера.

В режиме измерения спектров рассеяния основная проблема состоит в корректном учете (“вычитании”) сильного спектрального поглощения золя. Спектр рассеяния, измеренный без соответствующей корректировки, радикально отличается от истинного спектра углового рассеяния, который был бы измерен в образце бесконечно малого объема. Для учета поглощения две идентичные кюветы с образцом устанавливаются в положение 9б и в канал сравнения вместо диффузного отражателя (рис. 3.6). В приближении однократного рассеяния световой поток S_{90} , регистрируемый приемником, пропорционален теоретической интенсивности рассеяния I_{90} от N частиц в единичном объеме с учетом ослабления пучка до и после актов рассеяния. Можно показать, что в приближении малой приемной апертуры и малого рассеивающего объема величина S_{90} равна

$$S_{90}(\lambda) = \beta I_1(\lambda)T_b(\lambda)10^{-E(\lambda)}I_{90}(\lambda), \quad (3.34)$$

где β — постоянный коэффициент, зависящий от геометрии рассеяния и фотоприема. С учетом соотношений (3.32) и (3.34), из-

меряемое дифференциальное пропускание T_s^d равно

$$T_s^d(\lambda) = \frac{S_{90}(\lambda)}{I_2(\lambda)r_2(\lambda)T_b(\lambda)10^{-E(\lambda)}T_0(\lambda)} = \frac{\beta}{r_1(\lambda)}I_{90}(\lambda). \quad (3.35)$$

Таким образом, если коэффициент отражения $r_1(\lambda)$ постоянен в используемом спектральном интервале, то спектр дифференциального пропускания $T_s^d(\lambda)$ пропорционален теоретическому спектру однократного рассеяния $I_{90}(\lambda)$. Если не устанавливать кювету с образцом в канал сравнения, то измеряемый недифференциальный спектр определяется соотношением

$$T_s(\lambda) = \frac{\beta T_b(\lambda)}{r_1(\lambda)}10^{-E(\lambda)}I_{90}(\lambda). \quad (3.36)$$

Понятно, что из-за сильного поглощения вблизи плазмонного резонанса вид спектров (3.36) будет существенно отличаться от спектров $I_{90}(\lambda)$.

Поскольку геометрические характеристики пучков неидентичные, а разбаланс пучков $I_{1,2}(\lambda)$ по энергии может достигать 15%, было произведено тестирование диффузоров на спектральную нейтральность. Для этого вместо референтного диффузора (7 на рис. 3.6) было установлено специально изготовленное зеркало. Тестовые измерения показали, что интенсивность рассеяния света диффузором не изменяется на уровне 26% в диапазоне длин волн 400–600 нм, затем постепенно возрастает, составляя значения 27% на 650 нм 28% на 700 нм, 31% на 750 нм и 35% на 800 нм.

Поскольку интересующие нас изменения в золях золота происходили вне области 700–800 нм, спектральную коррекцию экспериментальных данных мы не проводили, считая, что для изготовленных нами отражателей $r_1(\lambda) = \text{const}$ в используемом диапазоне длин волн. Поэтому измеряемое пропускание пропорционально теоретическому спектру однократного рассеяния $I_{90}(\lambda)$.

Поскольку в процессе измерений приходится постоянно производить манипуляции, по крайней мере, с одним из диффузоров, нам было необходимо, прежде всего, убедиться в воспроизводимости результатов. Для этого были использованы стандартные тест-объекты, входящие в комплект принадлежностей

спектрофотометров "Specord M40" (M400) и флуориметрических приставок: платинированный светофильтр (режим пропускания/поглощения) и флуоресцентный образец-источник (режим светорассеяния). Многократные измерения тестовых образцов, равно как и реальных опытных объектов, показали, что воспроизводимость результатов находится в пределах паспортных характеристик прибора. Причем, спектры поглощения/пропускания полностью совпадали с таковыми в независимости от установки прибора (стандартная или с приставкой) при условии адекватной калибровки.

Обычно нефелометрические измерения проводят либо вне зоны поглощения образца, либо в тонких слоях, что эквивалентно сильному разведению системы. При регистрации дифференциальных спектров светорассеяния нам необходимо было убедиться в адекватности компенсации поглощения, поскольку оптические пути в опытном и референтном каналах не идентичны. Несимметричность схемы заключается, главным образом, в том, что в референтном канале рассеяние света осуществляется в *плоскости* диффузора, а в опытном — в *объеме* образца. При этом режим однократности рассеяния в объеме может и не выполняться. Кроме того, если геометрическое положение образца сравнения важно лишь в том смысле, чтобы в световой пучок не попадали мениск жидкости или стенки кюветы, то для опытного образца значение соосности кюветы и пучка является критичным. В нашей приставке пучок света проходит по центру кюветы, а интенсивность рассеяния при этом заметно ослабевает за счет бугеровского поглощения.

Спектральные зависимости бокового светорассеяния (кривые 2 на рис. 3.10) могут быть, в принципе, получены на однопучковых приборах типа спектрофлуориметров. Несмотря на то, что они не имеют четко выраженных пиков, и их спектральное положение является концентрационно-зависимым в силу искажающего влияния резонансного поглощения они могут быть трансформированы в истинные спектры рассеяния с учетом соотношения (3.36).

На рисунке 3.10 приведены графики спектральных зависимостей экстинкции (1), некомпенсированного светорассеяния (2)

и дифференциального светорассеяния (3) для КЗ 15 (а) и КЗ 30 нм (б). На этих же графиках приведены кривые (4) спектральных зависимостей дифференциального светорассеяния, вычисленные из экспериментальных спектров по уравнению (3.36) и скорректированные по значениям экстремумов, выводимых на термопечать прибором. Заметное расхождение экспериментальных и вычисленных кривых для 15 нм золя можно объяснить очень слабым сигналом от рассеивающего образца, сопоставимого по величине с нулевой линией (сигналом от кювет, заполненных чистым растворителем). В целом, по нашему мнению, можно говорить о вполне корректной компенсации поглощения.

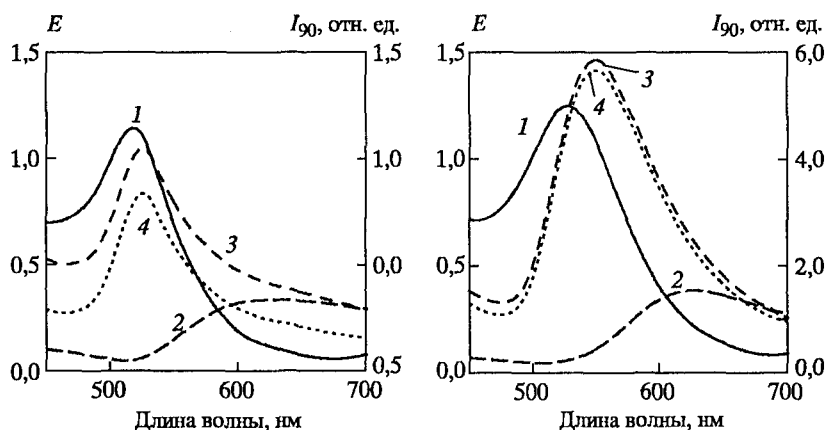


Рис. 3.10. Графики спектральных зависимостей ослабления E (кривые 1), некомпенсированного (2) и дифференциального (3) светорассеяния I_{90} для 15 (а) и 30 нм (б) зольей золота. Пунктирные кривые 4 получены пересчетом кривых 1 и 2 по уравнению (3.36)

Теоретический принцип размерной зависимости максимума экстинкции был использован нами для получения практической калибровки, основанной на комбинации данных спектрофотометрии и ЭМ [208, 307]. Эта методика оказалась удобной для оперативной оценки среднего размера и уже нашла ряд применений [212, 213]. Однако чувствительность спектрофотометрического метода, определяемая средним угловым коэффициентом зависимости, сравнительно мала и требует локализации максимума экстинкции с точностью не хуже 0,5 нм.

Нашей следующей целью было сравнительное исследование возможностей спектроскопии поглощения и дифференциального статического рассеяния для оценки среднего размера и полидисперсности золотых наночастиц. При этом мы сознательно ограничили диапазон размеров исследуемых суспензий (15–30 нм), одновременно сократив шаг с 15 до 5 нм. Дело в том, что достаточно изодисперсные и изоморфные золи золота могут быть получены по методу Френса [57] только в указанном диапазоне размеров. Использование же других известных методов синтеза (например, зародышевого, как в работе [176]) для решения задач данной работы мы сочли преждевременным, поскольку вопрос о влиянии ко- и противоионного слоя золотой мицеллы на оптические свойства коллоида является практически неизученным.

Размеры частиц золей, использовавшихся в нашей работе, были охарактеризованы различными способами. Особенности измерений ДРС будут обсуждены в следующем разделе. Основные спектральные характеристики и данные ДРС исходных золей и их смесей суммированы в табл. 3.2. Из этих данных видно, что измерения размеров методом ДРС хорошо согласуются с данными прогноза размеров частиц КЗ, получаемых по методу Френса, при строгом соблюдении соотношения цитрат-ЗХВК.

На рис. 3.11 представлены графики зависимости спектральных положений пиков экстинкции и светорассеяния (*a*) и величин пиков (*б*) от размеров частиц. Зависимость спектрального сдвига максимумов хорошо аппроксимируется линейной функцией с угловыми коэффициентами 0,7 для экстинкции и 1,68 для светорассеяния. Это означает, что при прочих равных условиях спектральный сдвиг максимума рассеяния в 2,4 раза больше такового для экстинкции. Зависимости величин максимумов экстинкции и светорассеяния различаются между собой более радикально. При изменении размера в 2 раза изменяется на 10%, в то время как $I_{90,\max} \sim d^{2,7}$. Показатель степени, близкий к 3, объясняется известными закономерностями дипольного рэлеевского рассеяния [308]. Существенные различия в зависимостях положений и величин максимумов экстинкции и светорассеяния от среднего размера частиц позволяют предположить, что полидисперсность золей должна по разному проявляться в этих спектрах.

Таблица 3.2

Спектральные характеристики золей золота различных размеров

Проба	Размер по данным ДРС (нм)*	$\lambda_{\text{ext max}}$ (нм)	E_{max}	Полуширина пика (нм)**	$\lambda_{\text{sca max}}$ (нм)	I_{90}^{max} (отн. ед.)
KЗ 15	18,4±2,1	518	1,14	80	525	0,84
KЗ 20	21,6±2,1	519	1,19	92	530	1,41
KЗ 25	24,6±2,2	524	1,23	90	539	2,55
KЗ 30	30,5±2	528	1,25	106	550	5,66
S1		524	1,25	90	541	3,91
S2		524	1,22	94	545	4,72

* Указан разброс данных при измерении одних и тех же образцов в разных режимах записи сигнала.

** В соответствии с работой [176], полуширина определена как удвоенное значение смещения экстинкции в красную область на уровне полувысоты пика.

Далее, для моделирования увеличения степени полидисперсности золей золота мы смешали пробы 20, 25, и 30 нм в различных соотношениях. Смеси готовили таким образом, чтобы по возможности сохранить форму нормального распределения частиц по размерам с постоянной средней арифметической и варьируемой дисперсией. Мы исходили из того, что при равной массовой концентрации объемы золей, содержащие одинаковое количество частиц в указанном ряду размеров (20, 25 и 30 нм), составляют 158, 309 и 533 единиц объема. Таким образом, смесь S1 содержала 316 мкл КЗ 20, 2618 мкл КЗ 25 и 1066 мкл КЗ 30, а смесь S2 — 631 мкл КЗ 20, 1236 мкл КЗ 25 и 2133 мкл КЗ 30.

На рис. 3.12 приведены гистограммы распределения частиц по размерам в смесях S1 и S2. При этом, если принять исходные золи как монодисперсные с указанными размерами, то для смеси S1 мы получим стандартное отклонение нм (12%), а для смеси S2 — нм (20%). Для проверки этого предположения мы использовали смеси золей золота, приготовленные как описано выше.

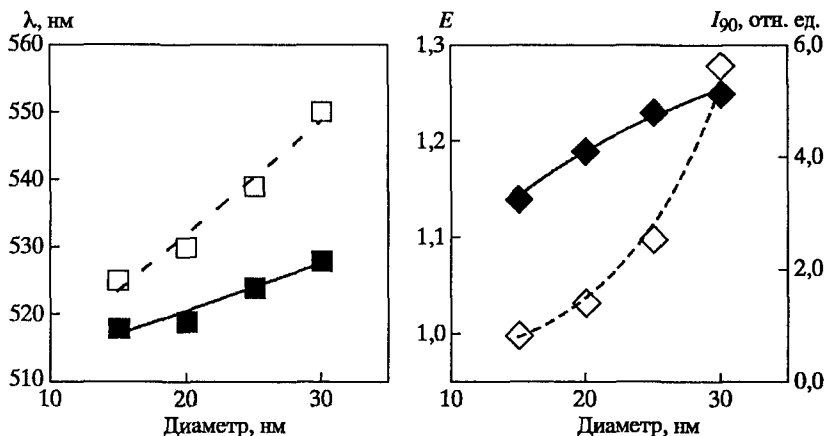


Рис. 3.11. Экспериментальные зависимости спектральных положений (а) и величин (б) максимумов ослабления (сплошные линии) и рассеяния (штриховые линии) от размера золотых частиц

Экспериментально измеренные спектры экстинкции и рассеяния смесей S1 и S2 в сравнении со спектрами золя КЗ 25 (S0) показаны на рис. 3.13а. Похожие по виду кривые, представленные на рис. 3.13б, соответствуют теоретическим расчетам спектров по теории Ми [22] для монодисперсных золей золота и их смесей в тех же соотношениях, что и в эксперименте. Отметим, что относительные единицы интенсивности светорассеяния, отложенные на правых осях ординат графиков рис. 3.13а и 3.13б, между собой не согласованы.

Обращает на себя внимание то, что теоретические (рис. 3.13б) и экспериментальные (рис. 3.13а) спектры экстинкции для всех трех образцов практически не отличаются. Об этом же свидетельствуют значения экстремумов, приведенные в таблице 3.2.

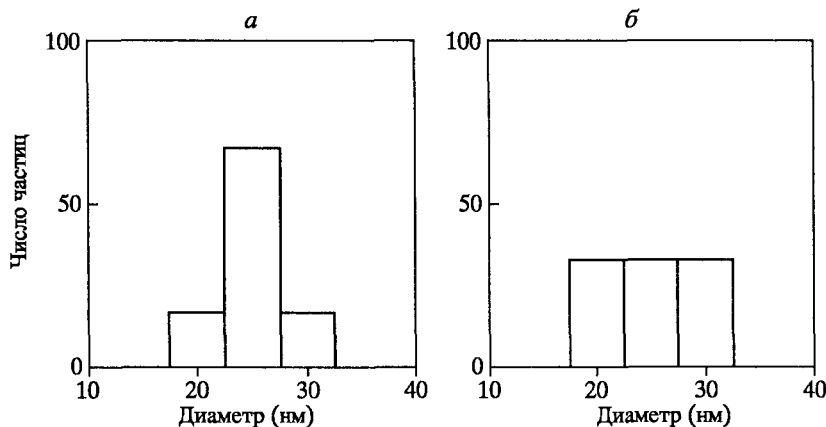


Рис. 3.12. Теоретические гистограммы распределения частиц по размерам в смесях S1 (а) и S2 (б)

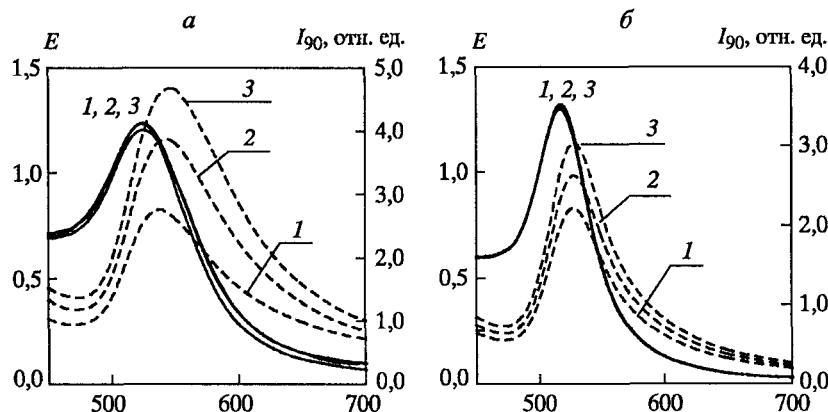


Рис. 3.13. Экспериментальные (а) и теоретические (б) спектры экстинкции $E(\lambda)$ (сплошные кривые) и дифференциального рассеяния $I_{90}(\lambda)$ (штриховые кривые). Цифрами обозначены образцы: 1 — исходный золь КЗ 25 нм, 2 — смесь S1, 3 — S2

В то же время теоретические и экспериментальные спектры светорассеяния для этих же образцов отличаются вполне заметно. Отметим, что относительные изменения максимумов рассеяния и их спектральных сдвигов более выражены в эксперименте, чем в расчетах по теории Ми. Кроме того, сами положения экспериментальных спектральных пиков рассеяния значительно сдвинуты в длинноволновую область против расчетных значений.

Такое несоответствие отмечалось нами в работе [308] и ранее авторами [148, 371].

Эти различия можно было бы попытаться объяснить полидисперсностью образцов, поскольку реальные золи золота, получаемые по методу Френса, имеют коэффициенты вариаций размеров частиц $\sim 15\%$ [176]. Однако расчеты спектров для золь с 20% -ой полидисперсностью приводят лишь к 1 нм красноволновому сдвигу против монодисперсной системы. В реальной же системе мы имеем смещения 2 нм и 6 нм в ряду S0–S1–S2. По-видимому, более сильная экспериментальная размерная зависимость спектрального сдвига связана не столько с полидисперсностью реальных частиц золотого коллоида, сколько с полиморфностью. В связи с этим можно отметить еще одно преимущество метода спектроскопии дифференциального светорассеяния — это возможность фиксировать проявление эффекта деполяризации рассеянного излучения, характерного для сферических элементарных рассеивателей.

Таким образом, мы показали, что дифференциальный способ позволяет измерить истинные спектры статического рассеяния I_{90} для сильнопоглощающих золь КЗ. Использование модифицированной флуориметрической приставки к двухлучевому спектрофотометру позволяет без перенастройки прибора получать практически одновременно спектры поглощения (экстинкции) и рассеяния света.

Основной результат данной части нашей работы состоит в том, что величина и положение пика спектра рассеяния более чувствительны к размерам частиц исследуемых золь, чем в случае спектра экстинкции. Поскольку спектральный максимум экстинкции слабо зависит от размера частиц, а максимум светорассеяния пропорционален кубу размера частиц золота при их постоянной весовой концентрации, то одновременное определение обеих спектральных зависимостей дает информацию (по крайней мере, качественную) о среднем размере и степени полидисперсности образцов. Мы предполагаем, что выявленные нами закономерности могут быть использованы при разработке методов исследования дисперсности не только коллоидных металлов, но и других систем. Например, оптически мягких частиц при наличии в них поглощающих веществ.

3.3. Динамическое светорассеяние

Кроме методов визуализации наноразмерных объектов с помощью обычной ЭМ техники, хорошие перспективы в определении морфометрических показателей имеют различные виды сканирующих зондовых микроскопов [102]. Однако эти методы, при всех их достоинствах, нельзя отнести к безартефактным и, самое главное, оперативным.

Гораздо более удобным в применении является метод ДРС, основанный на измерении автокорреляционной функции флуктуаций фототока, обусловленных броуновским движением рассеивающих частиц [219]. Сравнительно малое распространение метода в стандартной лабораторной практике обусловлено, прежде всего, высокой ценой оборудования. Оперативность метода зависит от интенсивности рассеяния и уменьшается для сильно разбавленных образцов. Обсуждение проблем, связанных с точностью восстановления функции распределения частиц по размерам, можно найти в работах [219, 382].

В литературе встречается несколько вариантов названия метода ДРС: квазиупругое рассеяние света, динамическое рассеяние света [219, 383], фотонная корреляционная спектроскопия [384], спектроскопия оптического смещения, оптическое гомо-(гетеро)динирование [385]. Эти названия по существу тождественны и отражают лишь специфику практической реализации метода.

Физическая основа метода связана с доплеровским сдвигом частоты рассеянного излучения за счет различных типов теплового движения (например, поступательной и вращательной диффузии частиц или макромолекул как целого объекта и сложного внутреннего движения полимерных цепей [386]). На практике подавляющий вклад в измеряемый флуктуационный сигнал вносит поступательная (трансляционная) диффузия.

В случае однократного рассеяния монохроматического света на некоторой большой совокупности частиц, находящихся в беспорядочном тепловом движении, спектр рассеянного света имеет вид лоренциана. Его полуширина связана с коэффициентом

том трансляционной диффузии, который зависит от размеров исследуемых частиц. В случае направленного движения в потоке происходит смещение спектра по оси частот на величину, пропорциональную средней скорости движения частиц. Это дает возможность применять данный метод для таких приложений, как измерение скорости кровотока и лимфотока (см., например, [387–389]).

Зависимость между характеристиками спектра рассеянного поля и спектра мощности флуктуаций фототока определяется методом детектирования сигнала. Различают два основных варианта метода: а) гомодинный метод, основанный на регистрации непосредственно флуктуаций интенсивности рассеянного света, и б) гетеродинный метод, когда регистрируется спектр флуктуаций фототока под действием излучения, состоящего из интересующего нас рассеянного излучения и опорного монохроматического света. В экспериментах по квазиупругому рассеянию в качестве опорного пучка обычно используется то же самое лазерное излучение, которым облучается исследуемая система. Это достигается с помощью полупрозрачных зеркал, направляющих часть лазерного излучения на фотоприемник в обход рассеивающей кюветы [385].

Выбор метода детектирования сигнала во многом зависит от применяемой аппаратуры. Для гетеродинного метода применяются спектроанализаторы, и размер частиц определяется по доплеровскому уширению спектра. С развитием вычислительной техники вместо гетеродинной схемы (с измерением доплеровского уширения) используют коррелометры для измерения автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности [219, 383, 390] (которая связана со спектром мощности по теореме Виннера–Хинчина [384, 386]). В случае рассеяния на сферических частицах автокорреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света представляет собой убывающую экспоненту с постоянной времени, пропорциональной коэффициенту диффузии частиц и квадрату модуля вектора рассеяния $q = 2k \sin(\theta/2)$, где $k = 2\pi n_0/\lambda$ — волновое число [383].

Для измерения размеров частиц методом ДРС мы использовали установку, собранную из стандартных компонентов. Источ-

ником света в ней служит гелий-неоновый лазер ГН-5П (ОАО "Плазма", Россия). Четырехсторонняя кварцевая кювета помещается в термостатируемый держатель, установленный на гониометре ГО-5 (Россия). С помощью водяного ультратермостата U7^C (MLW, Германия) и контрольного термистора температура в кювете устанавливается с точностью $\pm 0,1^\circ\text{N}$. Рассеянный световой сигнал принимается оптическим блоком, собранным на базе микролюминисцентной приставки ФМЭЛ-1М ("ЛОМО", Россия). Этот блок содержит фокусирующую оптику, две апертурные диафрагмы (1 мм и 0,1 мм), фотоумножитель ФЭУ-79 и предварительный усилитель. Сигнал с выхода усилителя через АЦП L-783 ("L-Card", Россия) записывается в файл на компьютере и затем обрабатывается. Программа обработки вычисляет автокорреляционную функцию флуктуаций фототока, интерпретируемую в терминах монодисперсного приближения [219], для определения средне- гидродинамического радиуса по измеренной постоянной, где $D(Rh)$ — коэффициент трансляционной диффузии частиц. Схема установки для измерения ДРС приведена на рис. 3.14.

Таким образом, в заключение к данной главе можно отметить, что уникальные оптические свойства коллоидных металлов, интенсивное резонансное поглощение и рассеяние света связаны с явлением ППР. При этом величины и спектральные положения пиков зависят от оптических констант (комплексного показателя преломления) дисперсной фазы, дисперсного состава металлозольей и диэлектрических параметров (показателя преломления) дисперсионной среды. Кроме того:

Широкая полоса поглощения в видимой области возникает из-за коллективных колебаний электронного газа на поверхности наночастиц (6s электроны полосы проводимости для Au, Ag, Cu), которые коррелируют с электромагнитным полем облучающего света, то есть, возбуждением когерентного колебания полосы проводимости.

ППР отсутствует для наночастиц Au с диаметром меньше чем 2 нм (так же как для металлического золота). При малых значениях размеров частиц (<40 нм) основной вклад в ослаб-

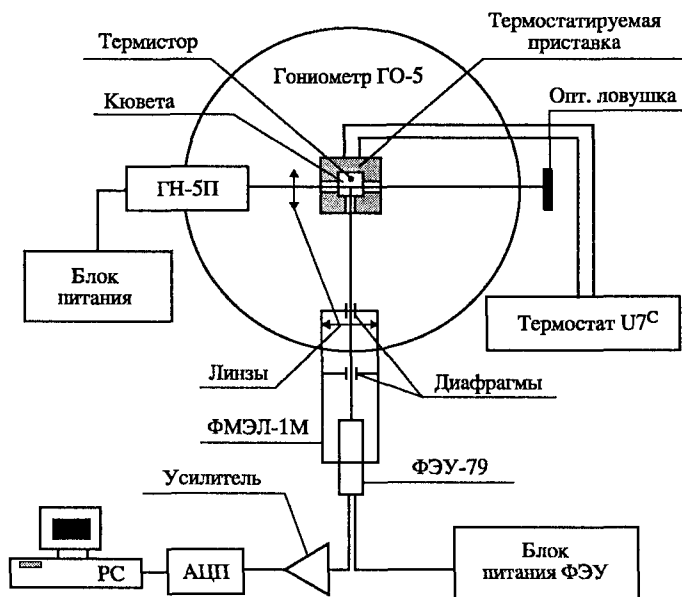


Рис. 3.14. Схема установки для реализации метода динамического светорассеяния в режиме записи аналогового сигнала

ление света вносит поглощение, а влиянием рассеяния можно пренебречь.

В случае рассеяния света на золотых частицах большого размера ($R \geq \lambda/20$) представление коэффициентов поглощения и рассеяния в рэлеевском (дипольном) приближении неверно и требуется расчет по теории Ми. В этом случае положения спектральных максимумов поглощения и рассеяния для золя золота будут отличаться и зависеть от размера частиц. Зависимость максимумов поглощения и рассеяния света от размера частиц золя позволяет построить калибровочные кривые для оперативного определения размера частиц по положению спектрального максимума экстинкции или рассеяния под углом 90° .

Несмотря на общую природу поглощения и рассеяния света металлическими частицами (а именно, возникновение плазмонных волн вследствие поляризуемости), характеристика светорассеяния имеет свои отличительные особенности. К ним следу-

ет отнести сложную угловую зависимость интенсивности упруго рассеянного света (индикатрисы), а также особенности взаимодействия с поляризованным светом (деполяризацию).

Зависимость спектрального сдвига максимумов хорошо аппроксимируется линейной функцией с угловыми коэффициентами 0,7 для экстинкции и 1,68 для светорассеяния. Это означает, что при прочих равных условиях спектральный сдвиг максимума рассеяния в 2,4 раза больше такового для экстинкции.

Поглощение и рассеяние света зависят не только от размеров и формы частиц, но и в большой степени от показателя преломления локального окружения. Поэтому, при установленных геометрических параметрах частиц, экспериментальное определение оптических характеристик золей является эффективным способом контроля процесса *функционализации* металлических наночастиц биомолекулами и качества получаемых маркеров. Этому феномену посвящена следующая глава монографии.

4. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

4.1. Общие принципы конъюгации наночастиц с биомолекулами

Гидрозоль золота представляет собой типичный лиофобный коллоид, несущий на поверхности частиц большой отрицательный заряд (поверхностный потенциал около 50 мВ) [391], и поэтому устойчивый лишь в условиях низкой ионной силы. У лиофобных систем дисперсионная среда и дисперсная фаза существенно различаются по химическому составу и строению на границе раздела, что проявляется в некомпенсированности поверхностных сил на межфазной границе. Такие системы термодинамически неустойчивы и требуют специальной стабилизации [27, 391, 392].

В силу термодинамической неустойчивости нестабилизированных лиофобных золей их агрегативная устойчивость может иметь лишь кинетический характер с достаточно малой скоростью коагуляции. Для водных дисперсий характерно преобладание электростатического барьера отталкивания между частицами. Механизм образования этого барьера связан с возникновением двойного электрического слоя, то есть с поверхностной диссоциацией вещества частиц, адсорбцией противоионов, компенсирующих заряд на их поверхности, и ориентированием диполей молекул растворителя или растворенных веществ [391, 393].

Под устойчивостью дисперсных систем понимают постоянство их свойств во времени. В первую очередь, степени дисперсности, распределения частиц дисперсной фазы по объему системы и межчастичного взаимодействия. Наиболее характерный и общий для дисперсных систем тип изменения степени дисперс-

ности связан с коагуляцией, заключающейся в слипании частиц [27, 391, 392] (при их слиянии употребляют термин “коалесценция”). Движущей силой коагуляции является избыточная поверхностная энергия. Поэтому основными факторами, обеспечивающими устойчивость дисперсных систем (при сохранении площади поверхности), будут те, которые снижают поверхностное натяжение. Их относят к термодинамическим факторам, уменьшающим вероятность результативных соударений между частицами, создающим потенциальные барьеры, замедляющим или практически исключаящим процесс коагуляции. Кинетические факторы, снижающие скорость коагуляции, связаны в основном с гидродинамическими свойствами среды: замедлением сближения частиц, вытеканием прослоек среды между ними.

Для лиофобных систем можно пренебречь адсорбционно-сольватным фактором устойчивости и учитывать только электростатическую составляющую расклинивающего давления (отталкивание) и его молекулярную составляющую (притяжение). Для водных дисперсных систем расклинивающее давление представляет собой разность гидростатических давлений между двумя межфазными поверхностями (при перекрывании их поверхностных слоев) и окружающей их фазой. Теория Дерягина-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) при выводе молекулярной составляющей учитывает наиболее универсальные и существенные лондоновские силы дисперсионного взаимодействия, определяемые суммированием взаимодействий между всеми молекулами или атомами в обеих частицах. В соответствии с теорией ДЛФО, положительная энергия отталкивания с увеличением расстояния уменьшается по экспоненциальному закону, а отрицательная энергия притяжения обратно пропорциональна квадрату расстояния. Таким образом, на малых (непосредственное слипание частиц) и больших (через прослойку среды) расстояниях между частицами преобладают силы притяжения. На средних расстояниях преобладает электростатическое отталкивание (потенциальный барьер препятствует слипанию частиц).

Для золей золота, как однокомпонентных по дисперсной фазе систем, при малых концентрациях электролита электроста-

тические силы отталкивания превалируют над молекулярными силами притяжения, кроме области малых расстояний. Скорость коагуляции в такой системе определяется вероятностью столкновения частиц, имеющих кинетическую энергию большую, чем энергия потенциального барьера. По теории ДЛФО добавка электролита в дисперсную систему вызывает сжатие двойного электрического слоя на поверхности частиц и снижение потенциального барьера между частицами, что делает возможным их сближение на расстояние, на котором начинают преобладать силы притяжения [394].

Сжатие двойного электрического слоя происходит за счет уменьшения электрического потенциала в результате электростатического взаимодействия и специфической адсорбции ионов добавляемого электролита на поверхности частиц (нейтрализационная коагуляция), а также из-за ограничения диффузии противоионов в раствор, так как ионная сила раствора увеличивается (концентрационная коагуляция). Наименьшая концентрация электролита, вызывающая начало медленной коагуляции, называется порогом коагуляции. Для быстрой коагуляции нужно добавить столько электролита к дисперсной системе, чтобы дальнейшее увеличение количества электролита не изменяло скорость коагуляции. Это условие отвечает критическому потенциалу двойного электрического слоя, а не его изоэлектрической точке. Многие золи к моменту коагуляции имеют на своих частицах критический потенциал в пределах 25–40 мВ [391, 392].

Устойчивость золя можно повысить путем покрытия частиц полимерным слоем (конъюгации с полимером) [28–31, 395]. Эта идея восходит к классическим работам Фарадея, изучавшим защитные свойства желатина [12]. Добавка очень малого количества полимера (особенно полиэлектролитов) к лиофобным коллоидам способна сильно повысить их агрегативную устойчивость, то есть стабилизировать лиофобные коллоиды. Защитный полимер способствует увеличению межфазного взаимодействия, адсорбируясь на поверхности частиц, покрывая ее полностью с образованием адсорбционного слоя и уменьшая поверхностное натяжение, а также способствуя образованию сольватного слоя. В итоге поверхность частиц приобретает свойства

вещества-стабилизатора (лиофилизирован) и лиофобный золь становится гораздо менее чувствительным к коагуляции электролитами (благодаря электростатическим, гидрофобным взаимодействиям и структурно-механическому фактору устойчивости).

Эффективность стабилизации зависит от растворимости добавляемого защитного полимера в дисперсионной среде, способности лиофобных частиц его адсорбировать на своей поверхности и степени заполнения этой поверхности стабилизатором. Наличие поверхностного адсорбированного полимерного слоя может свести к минимуму влияние межфазного натяжения благодаря обеспечению достаточного взаимодействия дисперсной фазы с дисперсионной средой. В результате значительно увеличивается энтропийная составляющая за счет участия молекул и ионов поверхностного слоя в тепловом движении вместе с частицами дисперсной фазы, обеспечивая тем самым агрегативную устойчивость систем. Избыток стабилизатора может привести к формированию второго слоя из его молекул, ориентированных противоположным образом, что снижает устойчивость системы. Недостаточное количество добавленного полимера также может снизить устойчивость системы, так как одна макромолекула может сорбироваться несколькими частицами, что инициирует их флокуляцию.

Для защитного действия важен, помимо молекулярной массы полимера, заряд его функциональных групп. Полимеры, содержащие как кислотные, так и основные группы, то есть полиамфолиты (аналоги протеина) или слабоосновные поликатионные макромолекулы с рН-зависимым защитным действием, являются наиболее эффективным средством стабилизации гидрозолей золота [29, 30, 396].

Количественное определение защитного действия полимеров на лиофобные коллоиды (в частности, на гидрозолы золота) было впервые предложено Жигмонди [14]. Данный метод и сейчас наиболее часто используется при проведении исследований в этой области. Жигмонди определял минимальное защитное количество гидрофильного полимера, достаточное для предотвращения коагуляции 10 мл золя золота при добавлении к нему 1 мл

10% раствора NaCl. Это количество лиофильного полимера, выраженное в миллиграммах, получило название “золотого числа”. Золотое число является общей мерой защитного действия, поскольку эмпирически найдено, что сильное защитное действие, предотвращающее коагуляцию золя золота, обычно проявляется в такой же степени и в отношении других подобных ему золей [27].

Способность полимеров (в том числе биоспецифических макромолекул) стабилизировать лиофобные коллоиды лежит в основе получения биоконъюгатов — стабильных комплексов КЗ с иммуноглобулинами, лектинами, ферментами, гормонами, липопротеидами и т.д. [397], сведения о которых будут представлены ниже.

Среди способов “посадки” биоспецифических зондов на КЗ метки выделяют два основных: адсорбционный и хемосорбционный. Каждый из которых имеет свои особенности в плане приготовления и использования маркеров. Согласно общепринятому мнению, стабилизация золотых коллоидов узнающими биомолекулами (*функционализация*) происходит путем пассивной адсорбции полимера на поверхности частицы за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий (см., например, [61, 165]). В работе [66] сообщается также о кулоновском взаимодействии между H_2N -группами лизина с цитрат-ионами на поверхности золотых наночастиц, полученных методом Френса. В последнее время появились сообщения о важной роли в осуществлении процессов связывания белков с поверхностью золотых частиц SH-групп молекул цистеина [398]. Схема связывания частицы КЗ с молекулой IgG представлена на рис. 4.1 (по данным [399]).

К преимуществам простой (физической) адсорбции относят минимальное воздействие на структуру макромолекулы, и как следствие, сохранение ее функциональных свойств. Однако, при использовании этого способа всегда следует учитывать возможную десорбцию и конкурирование с местами связывания на молекулах-мишенях. Основной особенностью адсорбции полимеров является то, что высокомолекулярные вещества обычно адсорбируются в количествах, много превосходящих

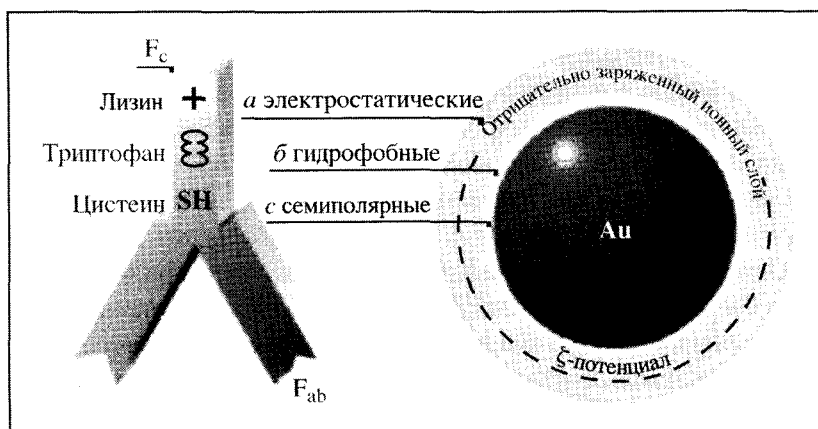


Рис. 4.1. Схема связывания частицы КЗ с молекулой IgG [399]

необходимые для образования мономолекулярного слоя. При этом в случае разбавленных растворов полимеров на изотермах адсорбции не наблюдается перегибов, которые свидетельствовали бы о формировании дискретного монослоя, как это наблюдается для низкомолекулярных ПАВ. Адсорбция индивидуальных молекул высокомолекулярных веществ в большинстве случаев носит необратимый характер. Это обусловлено относительно большим числом контактов макромолекул с поверхностью, когда одновременный разрыв всех связанных с ней звеньев является статистически маловероятным [30].

Известно, что между атомами серы и золота возникает донорно-акцепторная (семиполярная) связь (dative bound) [32, 400]. Этот факт привел исследователей к идее использовать для более прочной посадки биомолекул на золотые частицы алкантиольные линкеры (хемосорбционный способ). Химическую формулу алкантиолов можно представить в виде: $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{R}$, где R — $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ или $-\text{SO}_3\text{H}$, а n — от 11 до 22 [401]. При их взаимодействии с золотом образуются $\text{Au}(\text{I})$ -тиолаты: ${}_n\text{Au}^0 \cdot \text{Au}^+\text{S}^-(\text{CH}_2)_n\text{R}$ [130], организованные в монослой на поверхности частицы. Как отмечалось выше, алкантиолы использовали для получения самосборных дву- и трехмерных ансамблей золотых наночастиц [182–185]. В 1996 г. Чад Миркин с соавтора-

ми предложили способ посадки на 15-нм частицы золота олигонуклеотидов, тиолированных по 5'-концу [4]. В результате были получены очень стабильные конъюгаты, устойчивые к высоким и низким температурам, использованные авторами для колориметрического определения ДНК в растворе. Для создания конъюгатов с частицами порядка 30 нм ими же были предложены в качестве линкеров циклические дисульфиды [402], а для 100-нм частиц — *три*-гексилтиольные линкеры [403]. В работах [404, 405] для получения конъюгатов с золотыми наносферами и наностержнями использовали тиолированные белки — иммуноглобулины и авидин. Кроме алкантиолов в качестве линкеров используют фосфин-, амин- и карбоксил-содержащие лиганды [164]. Преимущества химического прикрепления наиболее ярко проявляются для линейных молекул, подобных ДНК, и обусловлены терминальной иммобилизацией, обеспечивающей строгую пространственную ориентацию зондов.

Однако, до сих пор самым популярным способом получения золотых маркеров для иммунохимических исследований следует признать нековалентную (адсорбционную) конъюгацию, сохраняющую в наибольшей степени нативную структуру биомолекул и, как следствие, их функциональные качества.

4.2. Процедура получения конъюгатов коллоидного золота с биоспецифическими макромолекулами адсорбционным способом

Процедура получения конъюгатов КЗ с биомолекулами включает приготовление и очистку раствора зонда, определение золотого числа, конъюгацию зонда с КЗ, внесение вторичного стабилизатора, концентрирование маркера и оптимизацию конечного продукта с контролем качества получаемых препаратов. Ниже мы кратко рассмотрим каждый из этих этапов.

Приготовление и очистка раствора зонда. Адсорбция биомолекул на золотых частицах зависит от ряда факторов: размера частиц, ионной силы раствора, количества, молекулярной массы и заряда добавляемого зонда. В большинстве случаев для успешного получения стабильного маркера значе-

ние pH золя и раствора зонда должно быть равным или на 0,5 выше pI зонда [406]. При оптимальных значениях pH и ионной силы раствора достигается максимальное число точек контакта макромолекулы с золотой частицей [61]. В табл. 4.1 приведены значения pH для зондов, наиболее часто используемых при получении золотых маркеров (по данным [165]).

Исходя из этого, мы разводили лиофильно высушенный препарат зонда в деионизованной воде непосредственно перед конъюгированием (оптимальная концентрация 1–2 мг/мл). Если это было невозможно — применяли растворитель с низкой ионной силой. Например, для растворения иммуноглобулинов использовали 2 мМ боратный буфер. Если зонд уже разведен в буфере с высокой ионной силой, проводили его обессоливание с помощью гельфильтрации или диализа против нужного буфера. Доводили pH золя золота до выбранных значений добавлением 0,2 М K_2CO_3 или 0,2 М H_3PO_4 , используя для измерения pH гель-наполненный электрод для предотвращения коагуляции золя KCl. Кроме того, для удаления возможных агрегатов перед конъюгацией раствор зонда центрифугировали при 100000 g в течение часа и использовали верхние 2/3 объема надосадка или фильтровали раствор через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Определение золотого числа. Для определения золотого числа в работе [406] рекомендовано построить изотерму адсорбции, фотометрически измеряя оптическую плотность золя ($\lambda = 580$) после добавления убывающих концентраций зонда и раствора NaCl до конечной концентрации 1%. Однако, практика свидетельствует о достаточной эффективности визуального контроля эффекта агрегации, выражающегося в заметном изменении цвета суспензии.

Мы проводили оценку устойчивости золя в зависимости от различных концентраций добавленного стабилизатора (биоспецифического зонда) с использованием агглютинационных титровальных планшетов с объемом лунок 250 мкл (либо набора прозрачных пробирок соответствующего объема). При этом двойные разведения зонда (начальная концентрация 1 мг/мл) в количестве 20 мкл смешивали с 200 мкл золя золота с оптимальным значением pH, затем в каждую лунку добавляли

Таблица 4.1

Значения рН для зондов, наиболее часто используемых при
получении золотых маркеров

Зонд	pH
1	2
Immunoglobulins (affinity purified antibodies)	9,0
F (ab') ₂	7,2
Protein A	5,9–6,2
<i>Ricinus communis</i> lectin I	8,0
<i>Ricinus communis</i> lectin II	8,0
Peanut lectin	6,3
<i>Helix pomatia</i> lectin	7,4
Soybean lectin	6,1
<i>Lens culinaris</i> lectin	6,9
<i>Lotus tetragonolobus</i> lectin	6,3
<i>Ulex europaeus</i> lectin I	6,3
<i>Bandeirae simplicifolia</i> lectin	6,2
Mannan from <i>Candida utilis</i> or <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,0
Horseradish peroxidase	7,2–8,0
Ovomucoid	4,8
Ceruloplasmin	7,0
Asialofetuin	6,0–6,5
Galactosyl bovine serum albumin	6,0–6,5
Bovine serum albumin	5,2–5,5
Peptide-bovine serum albumin conjugates	4,0–4,5

Таблица 4.1. (Продолжение)

1	2
Insulin-bovine serum albumin conjugates	5,3
Cholera toxin	6,9
Tetanus toxin	6,9
DNAase	6,0
RNAase	9,0–9,2
Low density lipoprotein	5,5
α_2 -macroglobulin	6,0
Avidin	~ 10,0–10,6
Streptavidin	6,4–6,6
Wheat germ agglutinin	9,9

20 мкл 10% раствора хлорида натрия. Минимальное количество зонда, при котором в данных условиях не происходило изменения цвета взвеси, мы рассматривали как золотое число.

Конъюгация зонда с меткой. Конъюгацию проводили смешением на магнитной мешалке зонда (в количестве, на 10–20% превосходящем золотое число) и золя золота с оптимальным значением pH. При этом обычно золотой золь добавляли к уже внесенному в колбу зонду. Процесс конъюгации продолжается 10 минут.

Внесение вторичного стабилизатора. Эту операцию осуществляли сразу после конъюгирования. Роль вторичного стабилизатора — препятствовать агрегации защищенных зондом частиц золя (если они не полностью покрыты биоспецифическим зондом). С этой целью мы чаще всего использовали 1% водный раствор биохимически инертного полиэтиленгликоля 20000 (ПЭГ 20М), внося его в перемешивающийся на магнитной мешалке раствор маркера до конечной концентрации 0,02% согласно [407]. Кроме ПЭГ в качестве вторичных стабилизаторов

иногда используют поливинилпирролидон, Tween 20, бычий сывороточный альбумин (БСА), овальбумин, желатин из глубоководных рыб и др. [61].

Концентрирование маркера. Данную операцию проводили с целью освобождения от несвязавшегося зонда и микроагрегатов. Для этого приготовленный маркер центрифугировали в течение 1 часа на центрифуге K24D (MLW, Германия) (золото со средним диаметром частиц > 10 нм) или на ультрацентрифуге L-17 (Beckman, США) (размер частиц 5 нм) при 4°C . Скорость центрифугирования определялась размером частиц золота и составляла:

60000 об/мин для частиц с диаметром 5 нм,
16000 об/мин для частиц с диаметром 10 нм,
11000 об/мин для частиц с диаметром 20 нм,
8000 об/мин для частиц с диаметром 30 нм.

В результате центрифугирования образуется подвижный осадок маркера с эквивалентным значением оптической плотности при длине волны 520 нм около 100. Кроме того, концентрирование можно проводить диализом против насыщенного раствора ПЭГ 20М. Однако эта процедура гораздо более трудоемка и продолжительна.

Оригинальный способ очистки маркера от несвязавшегося зонда предложен в работе [408]. Суть его заключается в следующем: 15-нм золотые частицы добавляли к маркеру, полученному с использованием 5-нм частиц. Крупные частицы адсорбировали несвязавшийся белок, и затем их отделяли центрифугированием.

Оптимизация конечного продукта. Если полученный маркер планировалось использовать для световой микроскопии или дот-блот анализа, то финальная стадия производства заключалась в разведении осадка, полученного после центрифугирования, до концентраций со значением оптической плотности $A_{520} = 5$. Для этого использовали 10 мМ фосфатный буфер, содержащий 0,02% ПЭГ 20М (третичный стабилизатор), 0,02 М азида натрия, 150 мМ хлорида натрия и 30% глицерина (криопротектор).

Если маркер был предназначен для электронной микроскопии, то использовали фракционирование препарата в градиенте вязкости глицерина [409]. Фракционирование проводили с использованием ультрацентрифуги. В центрифужных пробирках создавали градиент глицерина от 50 до 10% при его растворении в буфере, предназначенном для хранения препарата. Затем на верхний мениск осторожно наносили осадок маркера. Время центрифугирования определяли по формуле:

$$t = (9 \ln(x/x_0)\eta)/(8\pi^2 r^2 v^2 \rho), \quad (4.1)$$

где x — расстояние от оси ротора до дна пробирки (см), x_0 — расстояние от оси ротора до края пробирки (см), η — вязкость (Пз), r — радиус частицы (см), v — число оборотов (с^{-1}), ρ — плотность раствора (г/см^3). При этом практически монодисперсная фракция маркера, очищенная от агрегатов частиц и несвязавшегося зонда, собирается в зоне с концентрацией глицерина 30%. Собранный из данной зоны препарат распределяли по упаковочным аликвотам и хранили при -20°C .

Кроме того, оптимизировать конечный продукт можно методом гельхроматографии на колонке с сорбентом “Sephарозе 6В” или “Sephacril S400” [410, 411]. Однако, по нашему мнению, при организации серийного производства золотосодержащих биоспецифических маркеров предпочтение следует отдать методу седиментационного разделения в градиенте вязкости глицерина в силу большей производительности этого метода.

Контроль качества полученных препаратов мы осуществляли спектрофотометрическим методом. При анализе спектров поглощения света конъюгатами было установлено, что за счет адсорбции зонда на золотых частицах положение максимума смещается в длинноволновую область спектра на 4–8 нм, а оптическая плотность возрастает примерно на 10% по сравнению со спектрами исходного золя. Этот факт адекватно описывается двухслойной оптической моделью конъюгата [208]. Изменения этих показателей при приготовлении или хранении маркера в ту или иную сторону могут свидетельствовать либо о десорбции полимера с поверхности золотых частиц, либо об агрегационных процессах [334].

4.3. Оптическая модель биоконъюгатов: теоретический анализ

В качестве оптической модели биоконъюгата КЗ использовали двухслойную сферическую частицу с диаметрами ядра $d = 2R$, оболочки $d_s = 2R_s = d + 2s$ (s — толщина оболочки) и показателями преломления n и n_s соответственно. Реальный конъюгат отличается от этой модели, как минимум, по двум показателям: а) золотая частица не имеет строго сферической формы, б) адсорбированный биополимерный слой не является однородной диэлектрической средой с четкой сферической границей. Опыт показывает, что для адекватной теоретической оценки изменений (абсолютных или относительных) оптических свойств золотых наночастиц при адсорбции на них биополимеров эти отличия не имеют существенного значения.

Возможны два варианта адсорбционного взаимодействия биополимеров с наночастицами. В первом варианте исходной системой является взвесь золотых частиц, к которой добавляется полимер (например, желатин [334] или бычий сывороточный альбумин (БСА) [412]). В этом случае изменение оптических свойств определяется по отношению к свойствам частиц без полимерного слоя. Во втором варианте конъюгат коллоидного золота, как элементарный биосенсор, уже включает предварительно сформированный полимерный слой, состоящий из “узнающих” молекул, например иммуноглобулинов. Поэтому изменение оптических свойств, соответствующее биоспецифическому взаимодействию, следует, строго говоря, определять по отношению к оптическим свойствам конъюгатов до добавления молекул-мишеней. В данной главе мы не учитывали различий между этими двумя вариантами и оценивали изменение оптических свойств конъюгатов только по отношению к “непокрытым” частицам КЗ. В этом случае получаемые оценки сдвигов положения и максимума ППР имеют смысл верхних границ для всего двухстадийного процесса (приготовление маркера и тестирование образца с комплементарными молекулами).

Обсудим выбор параметров модели. Диаметр золотого ядра d рассматривался как варьируемый параметр оптимизации наносенсора¹, а спектральная зависимость показателя преломления золота $n(\lambda)$ рассчитывалась по методике, описанной в работе [307]. Для толщины оболочки в качестве основного значения мы выбрали $s=5$ нм. Эта оценка соответствует среднему размеру глобулярных белков с молекулярной массой ~ 150 кДа, типичной для IgG. Кроме того, это значение соответствует данным электронно-микроскопического анализа комплексов АТ-АГ (гаптен) [413] и конъюгатов КЗ с моноклональными АТ [86].

Судя по литературным данным [112, 310, 334], типичные значения показателя преломления оболочки n_s в видимом спектральном диапазоне лежат между 1,4 и 1,5. Причем, последнее значение близко к показателю преломления полимеров в плотных алканотиолатных монослоях [112], а первое соответствует значительной степени иммобилизации дисперсионной среды биополимерным слоем. Мы использовали в наших расчетах оба значения, считая их не зависящими от длины волны света. Для дисперсионной среды во всех расчетах использовался спектрально зависимый показатель преломления воды $n_0(\lambda)$ [307].

В приближении однократного рассеяния оптическая плотность или экстинкция (поглощение + рассеяние) взвеси двухслойных биоконъюгатов может быть записана в виде

$$A = \ln \frac{3c_g l}{2\rho_g} \left(\frac{d_s}{d} \right)^2 \frac{Q_{ext}}{d}, \quad (4.2)$$

где c_g, ρ_g — весовая концентрация и плотность золота, $Q_{ext} = C_{ext}/\pi R_s^2$ — коэффициент экстинкции, равный отношению сечения экстинкции C_{ext} к площади поперечного сечения частицы. В наших расчетах использовалась постоянная концентрация $c_g = 57$ мкг/мл и стандартная толщина кюветы $l = 1$ см, так что формула (4.2) сводится к

$$A = 19,2 \left(\frac{d_s}{d} \right)^2 \frac{Q_{ext}}{d}, \quad [d] = \text{нм}. \quad (4.3)$$

¹В наших расчетах диаметр d варьировался в диапазоне 5-200 нм, в данной работе основная часть результатов представлена для $d \leq 100$ нм.

Интенсивность однократного рассеяния под углом 90° пропорциональна элементу матрицы рассеяния Мюллера $S_{11}(90)$ [22] и числовой концентрации частиц $N = 3c_g/4\pi R^3 \rho_g$. В качестве характеристики углового рассеяния мы вычисляли безразмерную величину

$$I_{90}(\lambda) = \lg e \frac{3c_g l}{2\rho_g d} \left(\frac{d_s}{d} \right)^2 \left[\frac{16S_{11}(90)}{3x_s^2} \right] = \\ = \frac{19,2}{d} \left(\frac{d_s}{d} \right)^2 \left[\frac{16S_{11}(90)}{3x_s^2} \right], \quad (4.4)$$

где $[d] = \text{нм}$, $x_s = kR_s$ есть параметр размера, k — волновое число в дисперсионной среде. Выражение в квадратных скобках нормировано так, что для рэлеевских частиц оно равно нормированному сечению рассеяния $Q_{sca} = C_{sca}/\pi R_s^2$. Таким образом, в рэлеевском пределе спектр рассеяния $I_{90}(\lambda)$ будет совпадать со спектром интегрального рассеяния $A_{sca}(\lambda)$. В случае золотых частиц без покрытия ($d_s = d$) интегральные спектры такого типа ($Q_{sca}(\lambda)$) рассчитывались в работе [148], а для двухслойных сфер спектры $Q_{sca}(\lambda)$ представлены в [70].

Влияние полимерной оболочки на величину и положение спектральных максимумов экстинкции и рассеяния качественно объясняется в терминах элементарной дипольной модели рассеяния [22], которая обсуждалась в работе [112]. Поскольку результаты работы [112] содержат некоторые технические погрешности, мы обсудим этот вопрос чуть более детально.

В рэлеевском (дипольном) приближении [22] коэффициент поглощения малой двухслойной частицы можно записать в виде

$$Q_{abs} = 4x_s \text{Im} \left(\frac{\varepsilon_{av} - \varepsilon_m}{\varepsilon_{av} + 2\varepsilon_m} \right), \quad (4.5)$$

где ε_m — диэлектрическая проницаемость внешней среды, а ε_{av} есть средняя диэлектрическая проницаемость двухслойного шара с диэлектрическими проницаемостями ядра ε и оболочки ε_s

$$\varepsilon_{av} = \varepsilon_s \frac{\varepsilon + 2\varepsilon_s + 2f(\varepsilon - \varepsilon_s)}{\varepsilon + 2\varepsilon_s - f(\varepsilon - \varepsilon_s)}. \quad (4.6)$$

Параметр

$$f \equiv 1 - g = \frac{R^3}{(R + s)^3} \quad (4.7)$$

равен объемной доле ядра, соответственно g есть объемная доля оболочки. Формула (4.5) не учитывает вклада рассеяния в полную экстинкцию. В этой связи отметим, что для малых золотых частиц с небольшой полимерной оболочкой поглощение является доминирующим. Условие плазмонного резонанса, согласно (4.5), соответствует обращению в нуль знаменателя

$$\varepsilon_{av} = -2\varepsilon_m, \quad (4.8)$$

что приводит к соотношению для диэлектрической проницаемости ядра

$$\varepsilon = -2\varepsilon_s \frac{1 - f\alpha_s}{1 + 2f\alpha_s} = -2\varepsilon_s \frac{\varepsilon_s(1 - f) + \varepsilon_m(2 + f)}{\varepsilon_s(1 + 2f) + 2\varepsilon_m(1 - f)}, \quad (4.9)$$

которое слегка отличается от формулы (11) в [112]. Параметр

$$\alpha_s = \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_m}{\varepsilon_s + 2\varepsilon_m} \quad (4.10)$$

соответствует поляризуемости шара с диэлектрической проницаемостью оболочки ε_s во внешней среде с диэлектрической проницаемостью ε_m .

В случае малых значений объемной доли ядра ($f \ll 1$) формула (4.9) сводится к

$$\varepsilon = -2\varepsilon_s(1 - 3f\alpha_s). \quad (4.11)$$

Вклад оболочки в уравнении (4.11) в три раза отличается от результата (12) работы [112]. Однако качественный вывод [112] (указанный также ранее в [22]) о замораживании плазмонной моды при ($f \ll 1$) около значения $\varepsilon = -2\varepsilon_s$ и независимости этой моды от условий внешней среды остается безусловно справедливым.

Обсудим теперь смещение максимума резонанса на примере экстинкции. Условие резонанса (4.8) удобно представить в эквивалентном виде

$$\varepsilon = -2(\varepsilon_m + \chi), \quad (4.12)$$

где функция χ описывает влияние оболочки и определяется уравнением

$$\chi = g \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_m}{1 + 2\alpha_s(1 - g)}. \quad (4.13)$$

В пределе толстой оболочки $g \sim 1$ параметр $\chi \approx \varepsilon_s - \varepsilon_m$, и мы снова приходим к результату (4.11) с $f = 0$. В случае тонких оболочек ($g \ll 1$)

$$\chi \cong g \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_m}{1 + 2\alpha_s} = g \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_m}{3} \left(1 + 2 \frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_s} \right). \quad (4.14)$$

Подстановка (4.14) в (4.12) приводит к условию резонанса для тонких оболочек, которое отличается от аналогичной формулы (5) из работы [112] дополнительным множителем в скобках (он равен примерно 3 для полимерных оболочек).

Для оценки спектрального сдвига плазмонного резонанса воспользуемся элементарной формулой Друде без учета затухания [22]

$$\varepsilon' = \varepsilon_\infty - \frac{\lambda^2}{\lambda_p^2}, \quad (4.15)$$

где штрих означает реальную часть диэлектрической проницаемости, причем для золота можно использовать $\varepsilon_\infty = 12,2$ и значение длины волны плазменных колебаний $\lambda_p = 131$ нм [112]. Подстановка (4.12) в (4.15) дает значение несмещенного резонанса λ_{\max}^0 при $\chi = 0$ и смещенную длину волны максимума экстинкции λ_{\max} при $\chi \neq 0$, откуда

$$\frac{\lambda_{\max}^2 - (\lambda_{\max}^0)^2}{\lambda_p^2} = 2\chi. \quad (4.16)$$

Полагая $\lambda_{\max} = \lambda_{\max}^0 + \Delta\lambda_{\max}$, $\Delta\lambda_{\max} \ll \lambda_{\max}$, из формулы (4.16) находим

$$\Delta\lambda_{\max} = \chi \frac{\lambda_p^2}{\lambda_{\max}^0} = \lambda_p \frac{\chi}{\sqrt{\varepsilon_{\infty} + 2\varepsilon_m}}. \quad (4.17)$$

Формула (4.17) верна для оболочки любой толщины, причем в предельном случае толстой оболочки

$$\Delta\lambda_{\max}^{\infty} = \frac{\lambda_p^2}{\lambda_{\max}^0} (\varepsilon_s - \varepsilon_m), \quad g = 1. \quad (4.18)$$

Из уравнений (4.13) и (4.18) следует

$$\Delta\lambda_{\max} = \Delta\lambda_{\max}^{\infty} \frac{g}{1 + 2\alpha_s(1 - g)} \approx \Delta\lambda_{\max}^{\infty} g, \quad (4.19)$$

где в последнем соотношении мы учли, что типичное значение α_s для полимерных оболочек $\alpha_s < 0, 1$. Таким образом, в рэлеевском пределе смещение плазмонного резонанса экстинкции зависит от структуры частиц универсальным образом только через отношение s/R , поскольку

$$g = g(s/R) = 1 - \frac{1}{(1 + s/R)^3}. \quad (4.20)$$

На рис. 4.2 сплошными кривыми представлены спектры экстинкции и рассеяния для золей с постоянной весовой концентрацией частиц золота $c_g = 57$ мкг/мл в диапазоне диаметров $d = 40$ – 120 нм, а штриховые кривые показывают изменение спектров при адсорбции однородного полимерного слоя с толщиной $s = 5$ нм и показателем преломления $n_s = 1,5$. Адсорбция полимера приводит к увеличению максимумов плазмонных резонансов экстинкции и рассеяния, а также к неоднородному уширению спектров в красную область. Отметим, что для малых частиц с диаметром 5,2 нм аналогичные расчеты [112] предсказывают практически однородное уширение спектров в диапазоне толщин $s = 0,5$ – 2 нм, а расчеты спектров поглощения серебряных 30-нм частиц в вакууме с диэлектрическим покрытием ($s = 0$ – 3 нм, $n_s = 1,42$) [310] (см. также расчеты в [296])

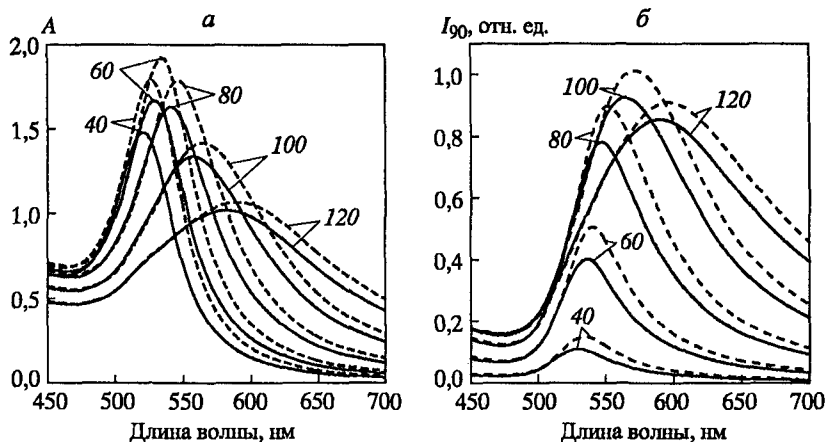


Рис. 4.2. Спектры экстинкции $A(\lambda)$ а и рассеяния $I_{90}(\lambda)$ б, рассчитанные для золотых частиц различного диаметра (сплошные кривые, цифры у кривых — значения d в нм) и для тех же частиц с полимерным покрытием (штриховые кривые). Показатель преломления и толщина оболочки равны $n_s = 1,5$, $s = 5$ нм

качественно отличаются от данных рис. 5.2а. Спектры бокового рассеяния золотых частиц (рис. 4.2б) качественно похожи на спектры интегрального рассеяния [148, 296], а влияние полимерной оболочки аналогично для спектров экстинкции и рассеяния (рис. 4.2а,б). Максимумы спектров рассеяния сдвинуты по отношению к максимумам спектров экстинкции на 10–20 нм в красную область (см. рис. 2 в [308]).

Зависимость максимальных величин экстинкции и рассеяния от размера и параметров полимерной оболочки представлена на рис. 4.3а,б. Наиболее сильно ослабляют свет частицы с размерами 60–80 нм, а максимальное рассеяние при постоянной концентрации дисперсной фазы достигается для частиц с диаметром около 100 нм.

Увеличение толщины оболочки от 5 до 10 нм при $n_s = 1,4$ (кривые 2 и 3 на рис. 4.3) приводит к более слабому росту значения максимумов экстинкции и рассеяния по сравнению с эффектом, связанным с увеличением показателя преломления от 1,4 до 1,5 (кривые 4). Поскольку значения максимумов экстинкции и рассеяния сами по себе довольно сильно зависят от размера

частиц, кривые на рис. 4.3 неудобны для оценки относительных изменений, связанных с адсорбцией биополимеров на поверхности частиц. Для оценки таких изменений введем два параметра δA_{\max} и δI_{\max} согласно соотношениям

$$\delta A_{\max} = \frac{A_{\max}(s) - A_{\max}(s = 0)}{A_{\max}(s = 0)}, \quad (4.21)$$

$$\delta I_{\max} = \frac{I_{\max}(s) - I_{\max}(s = 0)}{I_{\max}(s = 0)}. \quad (4.22)$$

Кривые на рис. 4.4а показывают зависимость параметров δA_{\max} и δI_{\max} от диаметра золотого ядра для двух значений показателя преломления оболочки толщиной $s = 5$ нм, а кривые на рис. 4.4б — аналогичные зависимости для двух толщин полимерной оболочки с показателем преломления $n_s = 1,4$. В обоих случаях рост параметров s или n_s увеличивает изменения максимумов экстинкции и рассеяния, причем наибольшие эффекты наблюдаются для наименьших частиц (в нашем случае $d_{\min} = 5$ нм).

Рис. 4.5 иллюстрирует влияние адсорбированного слоя на сдвиг положения максимумов экстинкции $\Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ и рассеяния $\Delta\lambda_{\max}^{\text{sca}}$ для частиц различного диаметра в диапазоне 10–100 нм. Для значений показателя преломления $n_s = 1,4$ спектральный сдвиг $\Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ практически не зависит от размера частиц вплоть до $d \approx 80$ нм.

Наибольшие спектральные сдвиги максимума рассеяния наблюдаются для малых частиц, а в области средних размеров величины $\Delta\lambda_{\max}^{\text{sca}}$ практически постоянны. Увеличение показателя преломления или толщины оболочки приводит к увеличению спектральных сдвигов.

Рис. 4.6а показывает зависимость $\Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ от отношения толщины оболочки к радиусу золотого ядра s/R . Хорошо видно, что основное увеличение спектрального сдвига происходит в диапазоне $0 \leq s/R \leq 1$, а затем зависимость $\Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}(s/R)$ для частиц с $d \leq 30$ нм (кривые 1–4 на рис. 4.6а) постепенно выходит на плато.

Данные рис. 4.5, 4.6 хорошо объясняются дипольной моделью. Отметим, что в уравнении (4.19) вместо подгоночных

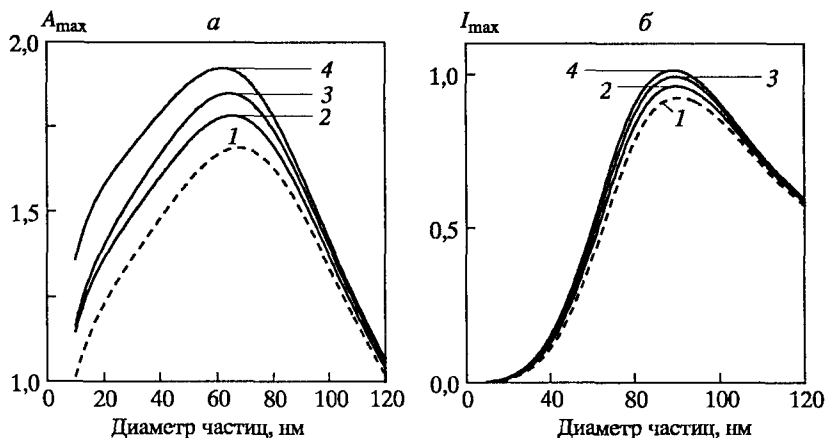


Рис. 4.3. Зависимость максимальной экстинкции A_{\max} а и максимального рассеяния I_{\max} б от диаметра частиц. Штриховая линия 1 — исходный золь ($s = 0$), 2 — $n_s=1,4$, $s=5$ нм; 3 — $n_s=1,4$, $s=10$ нм; 4 — $n_s=1,5$, $s=5$ нм

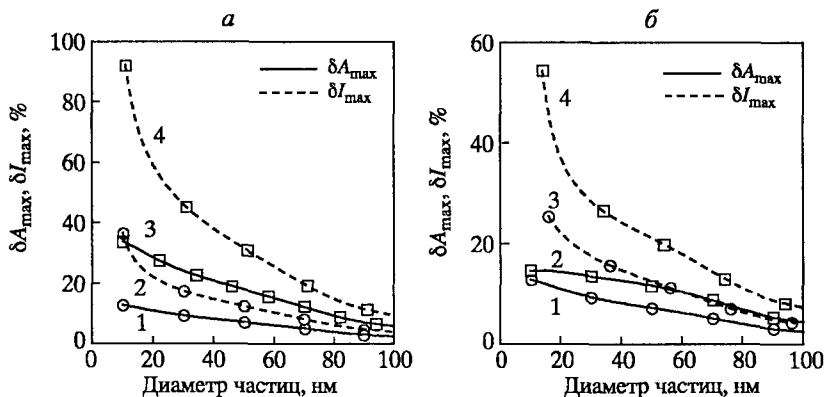


Рис. 4.4. Зависимость относительных изменений максимумов экстинкции δA_{\max} (сплошные кривые) и рассеяния δI_{\max} (штриховые кривые) от диаметра частиц при различных значениях показателя преломления а или толщины оболочки б. а — $n_s=1,4$ (1, 2) и 1,5 (3, 4), $s=5$ нм; б — $s=5$ (1, 3) и 10 (2, 4) нм, $n_s=1,4$

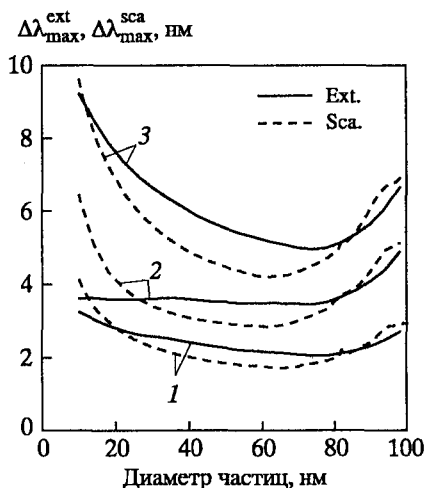


Рис. 4.5. Зависимость спектрального сдвига максимумов экстинкции $\Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ (сплошные линии) и рассеяния $\Delta\lambda_{\max}^{\text{sca}}$ (штриховые линии) от диаметра частиц. 1 — $n_s = 1,4$, $s = 5$ нм, 2 — $n_s = 1,4$, $s = 10$ нм, 3 — $n_s = 1,5$, $s = 5$ нм

параметров модели Друде ($\epsilon_\infty, \lambda_p$) используется единственный оптический параметр — максимальный спектральный сдвиг для толстой оболочки, который может быть определен из расчетов или эксперимента. Штриховая линия на рис. 4.6а соответствует уравнениям (4.19) и (4.20) с $\Delta\lambda_{\max}^\infty = 10$ нм и хорошо описывает точный расчет для небольших частиц. С ростом размера d отклонения от простой дипольной модели становятся более значительными, поэтому максимальный спектральный сдвиг становится размерно-зависимым. Чтобы продемонстрировать наглядно универсальный характер зависимости нормированного спектрального сдвига от объемной доли оболочки ($\overline{\Delta\lambda}_{\max} = \Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}/\Delta\lambda_{\max}^\infty \approx g$, см. уравнение (4.19)), мы приводим на рис. 4.6б результаты точного расчета $\overline{\Delta\lambda}_{\max}$ для частиц с диаметром 5, 10, 15, 30 и 45 нм (точки) вместе с универсальной штриховой прямой $\overline{\Delta\lambda}_{\max} = g$. Для нормировки в качестве $\Delta\lambda_{\max}^\infty$ использовались значения абсолютных спектральных сдвигов, соответствующие $g = 0,963$.

Рассмотрим теперь возможности приближенной дипольной модели для оценки влияния показателя преломления оболочки на спектральный сдвиг максимума. Из соотношений (4.18) и (4.19) следует, что при изменении показателя преломления оболочки отношение спектральных сдвигов примерно равно отношению разностей $\varepsilon_s - \varepsilon_m$. Для использованных в наших расчетах $n_s = 1,5$ и $n_s = 1,4$ соответствующее отношение равно примерно 2,6.

Эта оценка очень хорошо согласуется с результатами точного расчета. Например, для частиц с диаметром $d = 20$ нм $\Delta\lambda_{\max}(n_s = 1,5) \approx 7,6$ нм, $\Delta\lambda_{\max}(n_s = 1,4) \approx 2,8$ нм, так что отношение сдвигов $7,6/2,8 \approx 2,7$. Примерно такой же результат получается и для частиц с диаметром 10 нм.

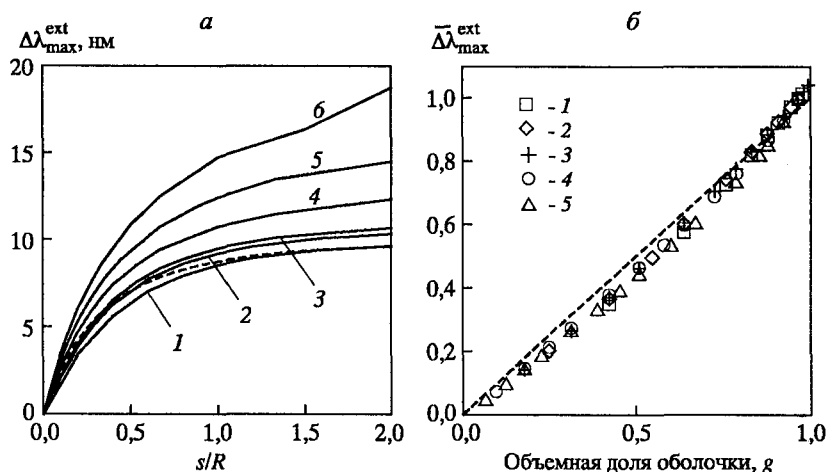


Рис. 4.6. *a* — зависимость спектрального сдвига максимума экстинкции $\Delta\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ от отношения толщины полимерной оболочки к радиусу частиц s/R . *б* — зависимость нормированного спектрального сдвига $\bar{\Delta}\lambda_{\max}^{\text{ext}}$ от объемной доли оболочки g . Расчет для $n_s = 1,5$ при различных диаметрах частиц $d=5$ (1), 10 (2), 15 (3), 30 (4), 45 (5) и 60 нм (6). Штриховые линии соответствуют уравнениям (4.19) и (4.20)

4.4. Оптическая модель биоконъюгатов: сравнение теоретических и экспериментальных исследований

Адсорбция полимеров на коллоидных частицах представляет значительный интерес для различных областей химической промышленности (фармацевтика, производство фотоматериалов, красок и т.д.) [163, 414], а также для физической химии дисперсных систем в связи с фундаментальной проблемой стабилизации коллоидов полимерными добавками [415], которая обсуждалась еще в пионерских исследованиях Фарадея по стабилизации золей золота желатином [12]. Особый интерес представляет адсорбция биополимеров на поверхности металлических наночастиц благородных металлов, обладающих четко выраженным локализованным ППР.

Адсорбция полимера приводит к изменению геометрических и диэлектрических параметров вблизи поверхности коллоидных частиц и, соответственно, к изменению их оптических свойств. В частности, для золотых или серебряных наночастиц полимерная адсорбция сдвигает величину и спектральное положение пика ППР [152, 305, 310, 334]. Несмотря на относительную малость подобных эффектов, их удалось использовать для исследовательских целей (изучение кинетики адсорбции желатина на золотых наночастицах [334], аналитическая химия белков [416]) и для важных прикладных задач (высокопроизводительные клинические анализы [417]).

Для исследования структуры адсорбционного слоя наиболее подходящими являются методы малоуглового нейтронного [418–420] или рентгеновского [421] рассеяния. Однако эти методы технически достаточно сложны, в особенности первый, предполагающий использование ядерного реактора. Метод ДРС [219] является в настоящее время наиболее надежным средством для определения гидродинамического радиуса частиц и, соответственно, его изменений, вызванных адсорбцией биополимеров. Например, в работе [422] методом ДРС была определена толщина слоя моноклональных антител на поверхности частиц КЗ с размером 40 и 60 нм, в то время как метод ТЭМ, по мнению

тех же авторов, оказался непригодным для этой цели. Это не означает, конечно, что ЭМ в принципе неприменима для анализа структуры биоконъюгатов (можно сослаться, например, на великолепную экспериментальную работу [86]). Тем не менее, задача развития новых достаточно простых и надежных экспериментальных подходов для исследования структуры и свойств биоконъюгатов остается актуальной.

В предыдущем разделе для интерпретации спектров экстинкции и рассеяния мы представили детальный теоретический анализ упрощенной структуры, в которой реальный конъюгат моделируется двухслойной частицей с золотым ядром и однородным полимерным покрытием. Эта модель является наиболее популярной в последнее время [306, 310, 334] в силу своей простоты и, возможно, благодаря известности и доступности программы для расчета оптических свойств двухслойных частиц на основе теории Ми [22].

Однако из теории [423] и эксперимента хорошо известно [418–420], что адсорбированный полимерный слой не является однородным, а содержит сегменты, непосредственно контактирующие с поверхностью (trains), а также “петли” (loops) и “хвосты” (tails) [423]. Другой недостаток двухслойной модели заключается в том, что она плохо приспособлена для описания процессов биоспецифического взаимодействия конъюгата с молекулами-мишенями. Синтезированный конъюгат КЗ, как элементарный биосенсор, уже включает предварительно сформированный или “первичный” полимерный слой, состоящий из узнающих молекул (например иммуноглобулинов, лектинов и т.п. [152, 424, 425]), причем этот слой, строго говоря, является неоднородным. Присоединение молекул-мишеней приводит к формированию нового или “вторичного” неоднородного слоя, плотность которого отличается от плотности первоначального слоя и уменьшается с увеличением расстояния от поверхности конъюгата. Принципиальной задачей теоретического моделирования является описание трансформации актов присоединения молекул-мишеней к специфическим сайтам конъюгата в измеряемый оптический сигнал. В терминах двухслойной модели с однородным полимерным покрытием такое моделирование тре-

бует искусственного пересчета параметров вновь образующейся неоднородной структуры в параметры усредненного однородного слоя.

Несмотря на отмеченные недостатки, двухслойная модель удобна в качестве отправного пункта для интерпретации экспериментальных данных. Более того, в случае простой однослойной адсорбции эта модель представляется вполне адекватным приближением. Разумеется, сама по себе двухслойная модель требует экспериментальной проверки в каждой конкретной ситуации.

В данном разделе представлены результаты исследования адсорбции двух типов полимеров (желатин и IgG человека) на золотых частицах с диаметром 15 и 34 нм тремя методами: спектроскопия поглощения, ДССР и ДРС. Для интерпретации данных нами предложена новая модель биоконъюгата с золотым ядром и многослойным неоднородным полимерным покрытием. В этой модели взаимодействие конъюгата с молекулами-мишенями естественным образом моделируется в терминах формирования нового неоднородного слоя.

В качестве оптической модели биоконъюгата КЗ мы предлагаем использовать многослойную сферическую частицу с диаметром $d_g = 2R_g$ и показателем преломления n_g золотого ядра, а также с двумя неоднородными оболочками, имеющими диаметры $d_1 = 2R_1 = d_g + 2s_1$ и $d_2 = 2R_2 = d_1 + 2s_2$ (s_1, s_2 — толщины оболочек). Каждая из оболочек может состоять из произвольного числа слоев (N_1 и N_2) с толщинами s_{1i} и s_{2i} и соответствующими показателями преломления n_{1i}, n_{2i} , так что выполняются соотношения

$$s_1 = \sum_{i=1}^{N_1} s_{1i}, \quad s_2 = \sum_{i=1}^{N_2} s_{2i}. \quad (4.23)$$

Для примера на рис. 4.7 приведена структура конъюгата с двумя двухслойными оболочками, где радиусы слоев R_{ij} равны

$$R_{11} = R_g + s_{11}, \quad R_{12} \equiv R_1 = R_g + s_{11} + s_{12} = R_g + s_1, \quad (4.24)$$

$$R_{21} = R_1 + s_{21}, R_{22} \equiv R_2 = R_{12} + s_{21} + s_{22} = R_{12} + s_2, \quad (4.25)$$

а показатели преломления слоев обозначены как $n_{11}, n_{12}, n_{21}, n_{22}$.

Разделение на первичную и вторичную оболочки в предлагаемой модели сделано из соображений удобства моделирования оптических свойств синтезированного конъюгата *до взаимодействия* с молекулами-мишенями (*первичная оболочка*) и *после взаимодействия* (*вторичная оболочка*). Если мы интересуемся только оптическими свойствами конъюгата с неоднородной оболочкой, то предлагаемая модель позволяет легко моделировать практически любой неоднородный профиль плотности адсорбированного полимера в терминах показателя преломления.

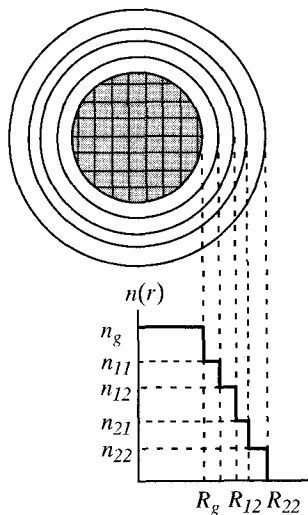


Рис. 4.7. Модель конъюгата с золотым ядром и двумя двухслойными оболочками. Внизу показан профиль показателя преломления. Принята следующая система обозначений радиусов R_{ij} и показателей преломления n_{ij} : первый индекс обозначает номер оболочки, второй — номер слоя в ней

Как уже отмечалось, возможны два варианта адсорбционного взаимодействия биополимеров с наночастицами. В первом варианте исходной системой является взвесь золотых частиц, к которой при соответствующих буферных условиях добавляется адсорбирующийся полимер (желатин [334], Tween-20 [308], про-

теин А, IgG [152, 308, 425], бычий сывороточный альбумин [412] и т.д.). Для таких конъюгатов изменение оптических свойств определяется по отношению к свойствам частиц без полимерного слоя, например, в виде разности соответствующих экстинкций A в методе спектроскопии поглощения или интенсивностей рассеяния I_{90} в методе ДССР

$$\Delta A_{10} = A_1 - A_0, \quad \Delta I_{10} = I_{90(1)} - I_{90(0)}, \quad (4.26)$$

где индексы 0 и 1 обозначают золотую частицу без покрытия и конъюгат с первичной оболочкой. Во втором варианте, когда исходный конъюгат уже включает предварительно сформированный полимерный слой, изменение оптических свойств, соответствующее биоспецифическому взаимодействию, определяется по отношению к оптическим свойствам конъюгатов до добавления молекул-мишеней. В эту категорию попадают, например, актуальные системы с биополимерами, ковалентно “пришитыми” к поверхности наночастиц с помощью тиолированных соединений [137, 207, 426] и разнообразные самосборные монослойные структуры [115, 310, 336]. Соответствующие дифференциальные спектры определяются как

$$\Delta A_{21} = A_2 - A_1, \quad \Delta I_{21} = I_{90(2)} - I_{90(1)}, \quad (4.27)$$

где индексы 1 и 2 обозначают конъюгат с первичной и вторичной оболочками.

В приближении однократного рассеяния оптическая плотность или экстинкция взвеси двухслойных биоконъюгатов рассчитывается по формуле (4.2). В качестве характеристики углового рассеяния неполяризованного света мы вычисляли безразмерную величину $I_{90}(\lambda)$ по формуле (4.4).

Выражение в квадратных скобках уравнения (4.4) нормировано так, что для рэлеевских частиц оно равно нормированному сечению или коэффициенту рассеяния $Q_{sca} = C_{sca}/\pi R_2^2$, поэтому спектр *углового* рассеяния $I_{90}(\lambda)$ будет совпадать со спектром *интегрального* рассеяния $A_{sca}(\lambda)$.

Уравнения для расчета интегральных коэффициентов экстинкции Q_{ext} , рассеяния Q_{sca} и амплитуд рассеяния S_{11}, S_{22} для

многослойных частиц по форме не отличаются от обычных уравнений теории Ми [22]

$$Q_{\text{ext}} = \frac{2}{x_2^2} \text{Re} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(a_n + b_n), \quad (4.28)$$

$$Q_{\text{sca}} = \frac{2}{x_2^2} \text{Re} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2), \quad (4.29)$$

$$S_{11} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} [a_n \tau_n(\theta) + b_n \pi_n(\theta)], \quad (4.30)$$

$$S_{22} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} [b_n \tau_n(\theta) + a_n \pi_n(\theta)], \quad (4.31)$$

где $\tau_n(\theta)$, $\pi_n(\theta)$ — известные угловые функции теории рассеяния [22, 303]. Основное отличие от теории Ми для однородных сфер заключается в том, что коэффициенты a_n, b_n зависят теперь от параметров размера ядра $x = kR_g$ и слоев $x_j = kR_{ij}$ (R_{ij} — радиус j -того слоя в i -той оболочке), а также от соответствующих относительных показателей преломления ядра n_g/n_0 и всех слоев n_{ij}/n_0 . Для расчета коэффициентов Ми многослойных сфер мы использовали эффективный рекурсивный алгоритм, предложенный в [427].

Спектральную зависимость показателя преломления золота $n_g(\lambda)$ рассчитывали по методике [307]. Мы выбрали в качестве основных значений толщин оболочек $s = s_1 = s_2 = 5$ нм. В случае желатина, имеющего конформацию статистического клубка [428], использовали неоднородную многослойную модель и значения $s = 15\text{--}20$ нм [334]. Значения показателей преломления слоев выбирали из диапазона 1,36–1,50, который охватывает все известные нам литературные данные [310, 306, 334], а показатель преломления воды $n_0(\lambda)$ рассчитывали по формуле из работы [307].

Для иллюстративных расчетов, приведенных в данном разделе, использовалась модель (рис. 4.7) со следующими параметрами: толщины слоев первичной оболочки $s_{11} = s_{12} = 2,5$ нм, показатели преломления $n_{11} = 1,50$, $n_{12} = 1,45$, толщины слоев

второй оболочки $s_{21} = 2$ нм, $s_{22} = 3$ нм, показатели преломления $n_{21} = 1,45$, $n_{22} = 1,40$.

На рис. 4.8 приведены спектры экстинкции и рассеяния, рассчитанные для частиц с диаметром $d_g = 20$ и 40 нм. Значения I_{90} даны в относительных единицах и увеличены по сравнению с рассчитанными в 100 раз. Из данной серии расчетов можно сделать два основных вывода:

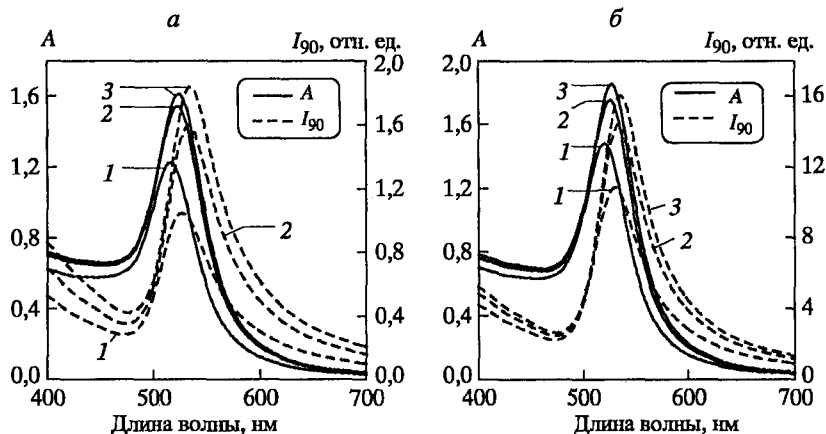


Рис. 4.8. Зависимость спектров экстинкции $A(\lambda)$ (сплошные линии) и интенсивности рассеяния $I_{90}(\lambda)$ (штриховые линии) для исходных золотых частиц (кривые 1), конъюгатов с первичной (2) и вторичной (3) двухслойными оболочками. Расчет для модели, показанной на рис. 4.7, с параметрами: диаметр золотого ядра $d_g = 20$ нм а и 40 нм б, толщины слоев первой оболочки $s_{11} = s_{12} = 2,5$ нм, показатели преломления $n_{11} = 1,50$, $n_{12} = 1,45$, толщины слоев второй оболочки $s_{21} = 2$ нм, $s_{22} = 3$ нм, показатели преломления $n_{21} = 1,45$, $n_{22} = 1,40$

изменения спектров, вызванные формированием первичной оболочки, аналогичны результатам работы [305], так что влияние слабой неоднородности показателя преломления оказывается несущественным;

формирование вторичной неоднородной оболочки практически незаметно по изменениям спектров экстинкции, но становится вполне детектируемым по изменениям спектров упругого рассеяния. Это подтверждает и теоретически обосновывает наши за-

ключения [152, 308] о потенциально большей чувствительности метода ДССР по сравнению с обычной спектроскопией поглощения.

Слабое изменение спектров при формировании вторичной оболочки качественно объясняется дипольной моделью двухслойного рассеивателя, обсуждавшейся в [305, 306]. В этих работах было показано, что при формировании адсорбционного слоя достаточной толщины мода плазмонного резонанса “замораживается”, т.е. определяется только локальным диэлектрическим окружением поверхности золотого ядра и не зависит от диэлектрических свойств удаленных слоев.

В реальных экспериментах [412, 417] более удобными и информативными являются разностные (или дифференциальные) спектры экстинкции и рассеяния, вычисляемые по уравнениям (4.25) или (4.26). На рис. 4.9 приведены такие спектры для случаев формирования первичной (кривые 1) и вторичной (кривые 2) полимерных оболочек. Спектральные положения максимумов изменения экстинкции в первом и втором случаях практически совпадают, но величина дифференциального резонанса для вторичной оболочки ($\Delta A_{21\max}$) заметно меньше, чем для первичной ($\Delta A_{10\max}$). Этот же вывод справедлив и для максимального изменения интенсивности рассеяния ($\Delta I_{10\max}$ и $\Delta I_{21\max}$). Для частиц с диаметром более 60 нм наблюдаются спектральные области с небольшим отрицательным эффектом, т.е. уменьшением экстинкции или рассеяния при формировании второй оболочки. Максимумы дифференциальных резонансов спектров $\Delta A_{ij}, \Delta I_{ij}$, $i = 1, 2$, $j = i - 1$, сдвинуты в красную область по сравнению с плазмонными резонансами экстинкции и рассеяния золотых частиц, а величина и форма дифференциальных резонансов существенно зависят от размера частиц. Эта зависимость тесно связана с проблемой оптимизации наносенсоров, сформулированной в нашей работе [305] и более подробно будет обсуждена в следующей главе.

В данном разделе описываются результаты нашей работы, в которой исследовалась адсорбция желатина и IgG на частицах КЗ размером 15 и 34 нм.

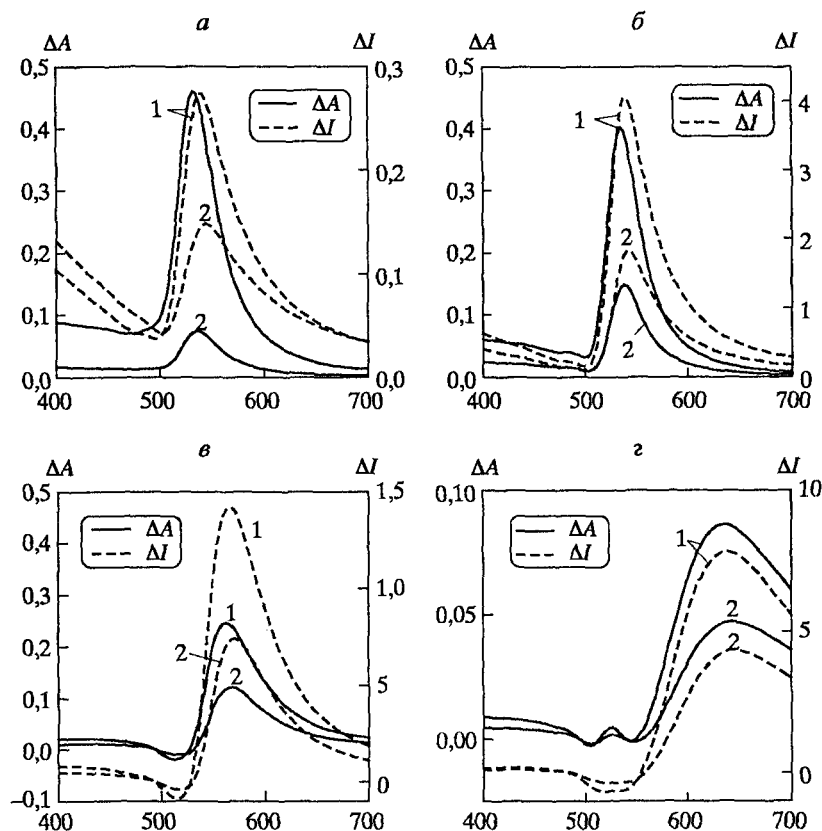


Рис. 4.9. Дифференциальные спектры экстинкции (сплошные линии) и рассеяния (штриховые линии), соответствующие формированию первой двухслойной оболочки адсорбированного полимера ($\Delta A_{10}, \Delta I_{10}$ — кривые 1) и второй двухслойной оболочки ($\Delta A_{21}, \Delta I_{21}$ — кривые 2). Расчет для модели на рис. 4.7, диаметр золотого ядра конъюгатов $d_g = 15$ — *a*, 40 — *б*, 80 — *в* и 120 нм — *г*

Для желатина стабилизирующие условия определялись только концентрацией полимера без подбора оптимального pH исходного золя. Получение конъюгатов проводили смешением 40 или 100 мкл раствора желатина (концентрация 10 мг/мл) с 4 мл исходного золя (концентрация золота 57 мкг/мл, оптическая плотность исходного золя в 1 см кювете при длине волны локализованный ППР была около 1,2). Для получения конъюгатов КЗ с

иммуноглобулином, рН исходного золя (4мл) доводили до значения $\text{pH} \approx 8$ добавлением 24 мкл 0,2 М K_2CO_3 и затем добавляли 32 мкл раствора IgG с концентрацией 1 мг/мл.

Измерение спектров экстинкции и рассеяния проводили на спектрофотометре "Specord M40" по методике, подробно описанной в главе 3. Для измерения размеров частиц методом ДРС мы использовали установку, собранную из стандартных компонентов (рис. 3.14).

На рис. 4.10 приведены спектры экстинкции и рассеяния для 34-нм частиц исходного золота (кривые 1) и после добавления K_2CO_3 и раствора IgG. Очень слабое изменение спектров после титрования поташом и их временное постоянство указывают на отсутствие агрегационных явлений. Независимым подтверждением этого служит практическая неизменность наклона автокорреляционной функции $g_2(\tau)$ (рис. 4.11, зависимости 1 и 2). Добавление раствора IgG увеличивает максимумы плазмонных резонансов примерно на 10% для экстинкции и на 20 % для рассеяния и сдвигает резонансы в красную область (примерно на 3 нм для экстинкции и на 4–5 нм для рассеяния). Спектральные сдвиги для экстинкции по порядку величины совпадают с литературными данными для других систем [306, 310, 334]. Используя теоретические расчеты для конъюгатов с полимерным слоем толщиной около 5 нм и с показателем преломления в диапазоне 1,40–1,45, мы убедились, что эти расчеты хорошо согласуются с графиками рис. 4.10. Поэтому мы можем предположить, что наблюдаемые изменения спектров связаны именно с формированием адсорбционного полимерного слоя, а не с другими, например агрегационными, эффектами. Результаты измерений методом ДРС (рис. 4.11, кривые 1–3) отлично согласуются с этим предположением. По данным этих измерений, добавление IgG приводит к изменению среднего гидродинамического размера с $d_g \approx 35$ нм на $d_1 = d_g + s \approx 45$ –46 нм, что соответствует средней толщине адсорбированного слоя $s = (45 - 35)/2 \approx 5$ нм. Это значение согласуется с оценками [422] толщины слоя моноклональных антител на поверхности золотых частиц 40 и 60 нм (метод ДРС).

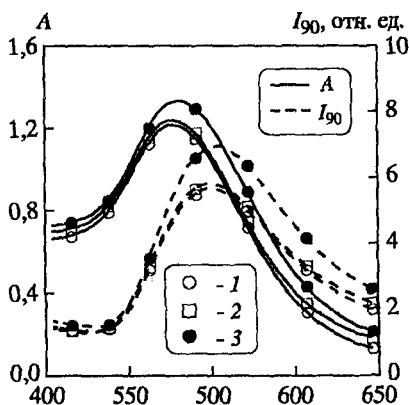


Рис. 4.10. Спектры экстинкции (сплошные кривые) и рассеяния (штриховые кривые) для исходного 34 нм золя (1), после добавления K_2CO_3 (1,2 мМ) (2) и последующего добавления IgG в концентрации 8 мкг/мл (3)

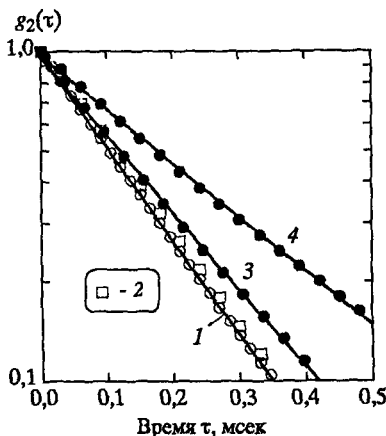


Рис. 4.11. Автокорреляционные функции фототока, измеренные для исходного золя (1), после добавления K_2CO_3 (2) и последующего добавления IgG (3) (измерения 1, 2, 3 проведены для образцов 1, 2, 3 на рис. 4.10). 4 — измерения для конъюгатов КЗ с желатином, соответствуют образцу 3 на рис. 4.12

Рис. 4.12 показывает изменения спектров экстинкции и рассеяния 34-нм золя при добавлении желатина. Отметим, что меньшая концентрация добавленного желатина (0,1 мг/мл в расчете на весь объем золя) вызывает более сильное изменение спектров (кривые 2), чем более высокая концентрация полимера (0,25 мг/мл, спектры 3). Эти различия связаны, очевидно, с недостаточной стабилизацией золя при более низкой концентрации полимера и незначительными эффектами агрегации в момент смешения. На это указывает, прежде всего, временная зависимость спектров рассеяния, а также характер изменения автокорреляционной функции. В дальнейшем мы обсуждаем только данные для концентрации желатина 0,25 мг/мл. Сопоставление спектров рис. 4.10 и рис. 4.12 обнаруживает большое сходство в изменениях величины и спектрального положения

максимумов поглощения и рассеяния. Отсюда напрашивается естественный вывод, что в обоих случаях формируется адсорбционный слой похожей толщины и структуры. Однако это предположение является ошибочным, в чем можно немедленно убедиться на основе данных ДРС, сравнивая зависимости 3 и 4 на рис. 4.11. Из наклона графиков на рис. 4.11 мы находим, что после адсорбции желатина гидродинамический диаметр частиц увеличился с $d_g = 35$ нм до $d_1 = 70 \pm 3$ нм, откуда средняя эффективная толщина адсорбированного слоя равна $s = 18 \pm 1$ нм. Это значение более чем в 3(!) раза превышает значение $s \approx 5$ нм для IgG, так что даже с учетом неизбежных ошибок измерений мы считаем это различие совершенно достоверным. Кроме того, примерно такое же значение (19 нм) получено в [429] и использовалось в [334] для оценки изменений спектров 15-нм частиц. Чтобы убедиться в том, что более чем трехкратное отличие в толщинах слоя не связано с какими-либо особенностями 34-нм частиц, мы повторили эксперименты рис. 4.10–4.12 с частицами 15-нм размера. Для примера на рис. 4.13 показано изменение спектров экстинкции и рассеяния при адсорбции желатина, введенного в концентрации 0,25 мг/мл. Снова мы видим полную аналогию со спектрами рис. 4.10 и 4.12. Однако измерения методом ДРС для этой системы дают значение среднего гидродинамического диаметра золотых частиц $d_g \approx 18$ нм, диаметр конъюгатов $d_1 \approx 47 \pm 3$ нм и среднюю толщину адсорбированного слоя $s \approx 15 \pm 2$ нм. Это значение близко к средней толщине 18 нм, полученной для 34 нм частиц, и в три раза больше, чем толщина слоя IgG, адсорбированного на частицах диаметром 34 и 15 нм.

Таким образом, за внешней похожестью спектральных изменений при адсорбции IgG и желатина скрывается, на самом деле, совершенно различная структура адсорбированного слоя, выявляемая по данным ДРС. Это означает, что мы столкнулись с проблемой объяснения поразительного сходства спектров экстинкции и рассеяния для конъюгатов с толщиной оболочки, отличающейся более чем в три раза.

Очевидно, что при одном и том же диаметре золотого ядра разница в результатах измерений ДРС (рис. 4.11) может быть

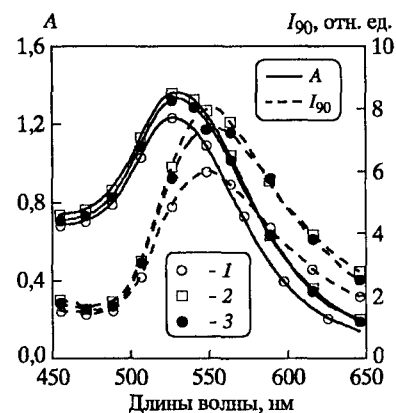


Рис. 4.12. Спектры экстинкции (сплошные кривые) и рассеяния (штриховые кривые) для исходного 34 нм золя (1) и после добавления желатина в концентрации 0,1 мг/мл (2) и 0,25 мг/мл (3)

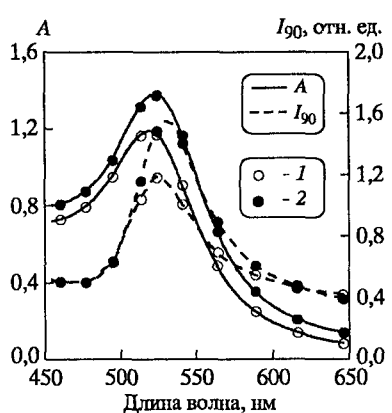


Рис. 4.13. Спектры экстинкции (сплошные кривые) и рассеяния (штриховые кривые) для исходного 15 нм золя (1) и после добавления желатина в концентрации 0,25 мг/мл (2)

связана только с толщиной оболочки. Разница же в толщинах оболочек при достаточно близких значениях молекулярной массы иммуноглобулинов и желатина связана с отличием их конформации (компактной (глобулярной) у IgG и рыхлой (статистический клубок) у гидрализата коллагена [428]). Пытаясь объяснить слабое изменение спектров экстинкции и рассеяния при конъюгации КЗ с желатином, мы рассмотрели сначала простую модель [305] с однородной оболочкой и выполнили расчеты для различных толщин s используя значение $n_s = 1,40$, характерное для желатиновых гелей в сходных условиях [430]. Поскольку удельный инкремент показателя преломления желатина такой же, как у большинства белков (0,0018 [430]), значение $n_s = 1,40$ соответствует примерно 40%-ому гелю. Результат расчета для 15-нм частиц показан на рис. 4.14а. Для толщин оболочки 15-20 нм изменения спектров экстинкции вполне укладываются в экспериментальный диапазон (рис. 4.13), однако теоретические изменения спектров рассеяния существенно превышают экспериментальные. В качестве другого значения n_s мы взяли 1,355, указанное в [334] и соответствующее примерно 13%-ому гелю;

Результат расчета (рис. 4.14б) показывает, что теперь изменения спектров рассеяния неплохо согласуются с экспериментом (рис. 4.13), однако изменения спектров экстинкции при этом слишком малы.

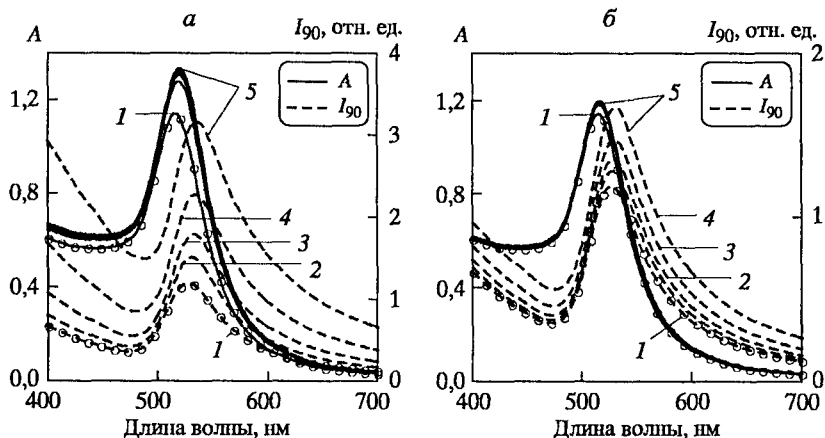


Рис. 4.14. Спектры экстинкции (сплошные кривые) и рассеяния (штриховые кривые), рассчитанные для 15 нм частиц (1) с однородным полимерным покрытием толщиной 5 (2), 10 (3), 15 (4) и 20 нм (5). Показатель преломления полимерного слоя $n_s = 1,40$ — а и 1,355 — б

Мы предположили, что решение проблемы может быть связано с учетом неоднородности толщины адсорбционного слоя. Из теории адсорбции полимеров известно [423], что пространственный профиль концентрации $\varphi(r)$ адсорбционного слоя полимера за пределами области непосредственного контакта сегментов макромолекул с поверхностью описывается экспоненциальным законом

$$\varphi(r_s) = \varphi_1 \exp(-Kr_s), \quad (4.32)$$

где r_s — расстояние от поверхности, φ_1, K — некоторые постоянные. Основываясь на простейших правилах аддитивности [431], мы предположили, что разность показателей преломления адсорбционного слоя n_s и окружающей среды n_0 (воды) также

подчиняется уравнению типа (4.31)

$$n_s(x) - n_0 = K_1 \exp(-Kx), \quad (4.33)$$

где $x = r_s/s$ — расстояние от поверхности в единицах толщины оболочки s . Подбирая константы K, K_1 в модели (4.32), мы учли, что средний показатель преломления слоя желатина по данным [334] равен примерно 1,36. Кроме того, мы предположили, что вблизи внешней границы слоя показатель преломления должен быть близок к n_0 (вода), а около поверхности — порядка 1,40.

На рис. 4.15 приведен модельный профиль типа (4.32)

$$n_s(x) = 1,333 [1 + 0,05 \exp(-2x)] \quad (4.34)$$

и его аппроксимация с помощью десяти однородных слоев. Ясно, что параметры модели (4.33) не определяются единственным образом при имеющейся экспериментальной информации, но мы полагаем, все же, что уравнение (4.33) является разумной аппроксимацией. Для расчета реального физического профиля $n_s(r_s)$ теперь достаточно задать только толщину оболочки. Учитывая, что по результатам экспериментальных измерений $s = 15-18$ нм (линия 4, рис. 4.11), мы приводим на рис. 4.16 расчеты спектров экстинкции и рассеяния для толщин адсорбированного слоя $s = 16$ нм и двух использовавшихся в экспериментах диаметров частиц 15 и 34 нм. Для удобства сравнений экспериментальных и теоретических спектров рассеяния последние были нормированы так, чтобы их максимумы совпадали с экспериментальными. В отличие от данных для однородной модели (рис. 4.14), спектры на рис. 4.16 хорошо согласуются с измерениями и спектров экстинкции, и спектров рассеяния, представленных на рис. 4.12 и 4.13. Что касается деталей спектров (величина и положение максимумов, полуширина и т.д.), согласие теоретического описания с экспериментом требует аккуратного учета многих факторов, в том числе отклонения формы частиц от сферической и их полидисперсности по размерам. Пример такого исследования для неконъюгированных золей описан в [307].

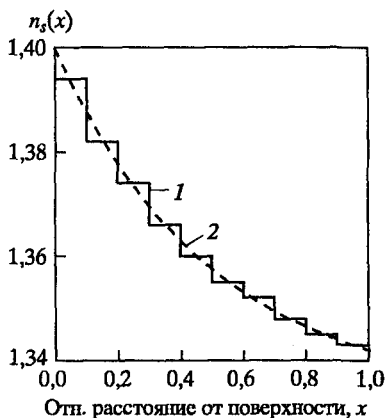


Рис. 4.15. Модельный 10-слойный профиль показателя преломления для адсорбированного слоя желатина. Штриховая кривая показывает зависимость согласно уравнению (4.32)

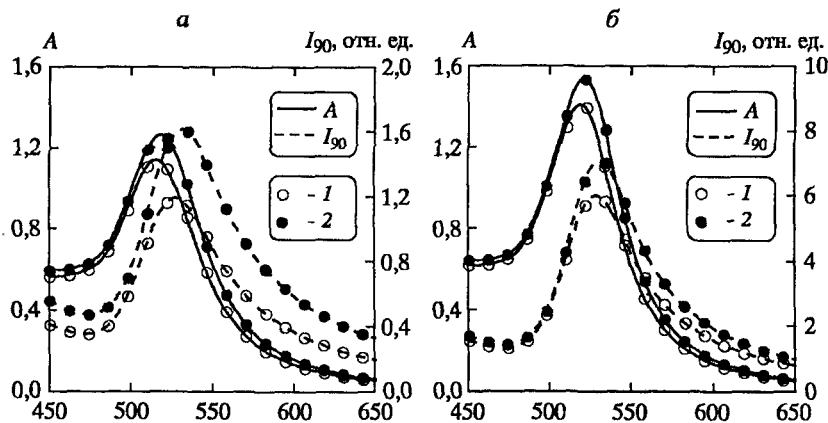


Рис. 4.16. Спектры экстинкции (сплошные кривые) и рассеяния (штриховые кривые) для 15 нм (а) и 34 нм (б) конъюгатов КЗ с модельным профилем показателя преломления адсорбированного желатина (рис. 4.15). Толщина полимерного слоя равна 16 нм

Таким образом, в данном разделе представлено экспериментальное исследование адсорбции двух типов биополимеров (глобулярный IgG и желатин с конформацией статистического клубка) на золотых частицах двух размеров 15 и 34 нм с использованием трех методов: спектроскопии поглощения, ДССР и ДРС.

Кроме того, мы исследовали также адсорбцию другого глобулярного белка с меньшей молекулярной массой (фермент трипсин). Во всех трех случаях мы обнаружили небольшие изменения спектров экстинкции (увеличение и смещение ППР) и более заметные, но аналогичные изменения спектров рассеяния. По данным метода ДРС толщина адсорбционного слоя была 3–5 нм для трипсина, 5–6 нм для IgG и 15–18 нм для желатина. В случае глобулярных белков моделирование спектров двухслойной моделью с однородной полимерной оболочкой (показатель преломления $n_s = 1,40\text{--}1,45$) дает хорошее согласие с экспериментальными спектрами экстинкции и рассеяния. Однако в случае желатина хорошего согласия с экспериментом удалось добиться, используя неоднородную модель в виде 10 слоев с уменьшающейся плотностью. Требуемые для такого моделирования параметры слоя находятся в разумном соответствии с теоретическими данными по адсорбции полимеров на поверхностях [426], а также с экспериментальными результатами, полученными независимыми методами [334].

Адсорбционная модель взаимодействия конъюгата с молекулами-мишенями имеет важный биологический прототип: выявление АГ конъюгатами, мечеными моноклональными антителами, или связывание обычных или *“биспецифических”* [432] моноклональных антител с антигеном, иммобилизованным на поверхности сенсора. В настоящее время для исследования аффинности (степени сродства отдельных сайтов антител к конкретному эпитопу антигена) и общей эффективности связывания антител (авидности) применяются сенсоры на основе нарушенного полного отражения [118, 432]. Недавние эксперименты бельгийской группы [417, 433, 434] и разработка [336] указывают на принципиальную возможность использования для этих же целей более простой техники, основанной на изменении спектров экстинкции. Результаты нашей работы вместе с данными [152, 308, 305] позволяют предположить, что метод ДССР также имеет хорошую перспективу в качестве альтернативы дорогим сенсорам, основанным на изменении отражающих свойств призм или зеркал при адсорбции биологических макромолекул.

4.5. Хемосорбционный способ получения конъюгатов коллоидного золота с 5'-тиоолиготимидином

Как отмечалось выше, в зависимости от сил, ответственных за взаимодействие адсорбата и адсорбента, различают физическую и химическую адсорбцию. Химическая адсорбция основана на ковалентных или близких к ним связях адсорбата с твердой поверхностью. Хемосорбция обладает более высокой энергией связи, не зависит от температуры и необратима [435].

Хемосорбционный способ получения конъюгатов КЗ основан на использовании тиольных или дисульфидных и фосфиновых лигандов, содержащих терминальную карбокси-, amino-, или малеими́до- группы. Такой подход позволяет связывать биологические компоненты карбодии́мид опосредованной этерификацией и амидированием или реакцией с тиольной группой.

Одним из вариантов функционализации металлических наночастиц является использование специфических реакций с тиолами (например, цистеиновыми остатками белков) посредством малеимидных групп или с amino-группами через *N*-гидроксисукцинимид [198]. Другие специфические реакции могут использоваться для пришивки группировок сахаров в гликопротеинах. Они формируют стабильные ковалентные связи и позволяют получать конъюгаты даже с такими молекулами, которые не адсорбируются на золотых наночастицах. Процедура мечения чрезвычайно проста и содержит этапы смешивания КЗ реактива с раствором биомолекул, инкубации в течение нескольких часов и очистки конъюгата методами гельпроникающей хроматографии, ультрафильтрации или диализа (для удаления непрореагировавших золотых частиц и немеченых молекул) [198].

Однако, наиболее широкое распространение химическое прикреплeние получило для создания ДНК-маркеров. Высокая чувствительность и селективность молекулярного узнавания, основанная на комплементарных ДНК-ДНК, ДНК-РНК взаимодействиях в совокупности с уникальными оптическими свойствами плазмонно-резонансных наночастиц коллоидных систем благородных металлов положили начало созданию нового разде-

ла междисциплинарной науки — молекулярной нанотехнологии [140]. Большинство работ данного направления основаны на так называемых планарных решениях с детектированием актов молекулярного узнавания современными высокотехнологичными методами, такими как зондовая микроскопия или световая микроскопия темного поля [436]. Кроме того, синтез и изучение физико-химических свойств ДНК-функционализированных металлических наночастиц представляет самостоятельный интерес в связи с бурным развитием нанобиотехнологии и ее многообещающих приложений в химии, биологии и медицине [103].

Выбор молекулярно-биологической модели нашего исследования, а именно: гомоолигомерных зондов — олиготимидина (олиго(Т)) и гомополимерных молекул-мишеней — полиаденина (поли(А)), обусловлен тем, что состав и структура поли(А) сегментов мРНК коррелируют с функциональной активностью живой клетки [437]. Кроме того, высокоспецифичные свойства молекулярного узнавания олигонуклеотидов, в частности, олиго(dТ)/поли(А), объединенные с уникальными оптическими свойствами золотых наночастиц, были использованы [438] для развития биодатчика типа сухого стрип-теста, который позволяет высокоселективно визуально обнаруживать двойную скрученную ДНК в течение нескольких минут.

Идея использования частиц коллоидного золота в качестве меток нуклеотид-нуклеотидных взаимодействий не нова. Частицы КЗ в комплексе с поли(dТ) последовательностями использовались еще в 1981 г. для картирования политенных хромосом методом гибридизации *in situ* на электронно-микроскопическом уровне [439]. Новый импульс использованию металлических наночастиц в качестве меток биоспецифических маркеров был придан введением в практику пришивки макромолекул-зондов посредством тиольных производных [4]. Такие маркеры обладают двумя существенными отличиями от традиционно используемых в электронной цито- и гистохимии [61], основанных на чисто адсорбционных, т.е. кулоновских, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействиях метки (металлической наночастицы) и зонда (биомacroмолекулы). Во-первых, высокая стабильность маркеров, функционализированных через тиольные производ-

ные биомолекул, обеспечивается прочной связью RS-M. Для RS-Au энергия связи составляет примерно 40 ккал/моль [130]. Во-вторых, использование однородных синтетических макромолекул способствует образованию самосборных монослоев на поверхности частиц [130, 164].

Публикация пионерской статьи Миркина и соавторов [4] продемонстрировала реальную возможность создания трехмерных управляемых самосборных структур металлических наночастиц, и в настоящее время уже известны практические применения этого эффекта в диагностических молекулярно-генетических приложениях [123, 127, 137]. Оптические изменения, происходящие при агрегации коллоидно-золотых систем, объясняются сильным электромагнитным взаимодействием контактирующих частиц [294, 440, 441] или частиц, разделенных диэлектрической прослойкой порядка нескольких нм [442–444]. В результате этого взаимодействия в процессе солевой [440] или биоспецифической [439, 444] агрегации полоса плазмонного резонанса существенно уширяется (по сравнению с резонансом индивидуальных частиц) и сдвигается в длинноволновую область спектра поглощения. Визуально это проявляется в резком изменении цвета золя с красного на синий или серый. В работе [442] проведен подробный анализ влияния длины молекул ДНК-зондов на поглощение света в оптическом диапазоне в процессе гибридизации-плавления маркеров с мишенями. Селективное колориметрическое определение полинуклеотидных последовательностей в таких системах основано на перекрестном “хвост к хвосту” связывании специфических олигонуклеотидных последовательностей зондов с молекулами-мишенями. Диагностическая система, как правило, состоит из двух зондов, не комплементарных друг другу, иммобилизованных на частицах КЗ посредством тиомодификаторов 3' или 5' концов олигонуклеотидов. При этом расстояния между частицами в агрегатах определяются длиной молекул-зондов и расположением участков комплементарных им последовательностей в полинуклеотидной цепи мишени.

Поглощение и рассеяние света металлическими наночастицами в общем случае зависит от их размера и формы, а также от

параметров общего и локального диэлектрического окружения [296, 444]. Например, взаимодействие узнающих молекул маркера с молекулами-мишенями может не приводить к образованию агрегатов частиц (при отсутствии перекрестных сшивок), а просто сопровождаться изменением средней толщины и плотности полимерной оболочки вокруг металлического ядра маркера.

Другим примером спектральных изменений золотых маркеров, не связанных с агрегацией, является адсорбционная стабилизация золотых золь биополимерами или синтез стабильных суспензий биоконъюгатов [61, 164]. В этих случаях, в отличие от агрегации, изменение параметров диэлектрического окружения золотых наночастиц приводит к довольно слабым изменениям рассеивающих и поглощающих свойств маркеров. Тем не менее, эти слабые, но воспроизводимые изменения в спектрах экстинкции [112, 433] и статического светорассеяния [221, 305] могут быть использованы для диагностических целей [445]. Рекордные показатели по чувствительности оптического детектирования биомолекулярного узнавания были недавно достигнуты с использованием техники измерения спектров рассеяния от отдельных частиц [138, 139], которая также основана на зависимости ППР золотых или серебряных наночастиц от свойств локального диэлектрического окружения.

Пример использования олиго(dT) функционализированных КЗ маркеров для выявления их взаимодействия с поли(А), приведенный в патенте Миркина и др. [446], ограничивается описанием варианта твердофазного анализа в тонком слое силикагеля — “спот” теста на пластинах после замораживания-оттаивания. К сожалению, в этом конкретном примере ничего не говорится ни об изменении цвета в растворе, ни о возможности индуцирования реакции плавлением-отжигом. Поэтому вопрос о том, какой процесс лежит в основе оптических изменений в системе взаимодействующих гомополимерных нуклеиновых кислот на поверхности частиц остается открытым.

Лиганды оболочки также изменяют показатель преломления и приводят к красному или фиолетовому смещению. При этом экспериментально получаемые спектроскопические данные часто отклоняются от предсказания теории Ми [6], которая в

классическом виде описывает поляризацию безоболочечных наночастиц. Согласие с теорией Ми может быть получено только, когда во внимание приняты изменения, вызванные оболочками [22]. Эти изменения особенно существенны с серосодержащими лигандами, которые являются ответственными за сильное полевое взаимодействие лиганда с поверхностным электронным облаком наночастиц. Фактически, так как все золотые наночастицы нуждаются в стабилизирующих лигандах или полимере, энергия плазмонной полосы редко точно совпадает с теорией Ми, если не принимать во внимание изменения привносимые этим стабилизатором [164].

В работе [447] нормализованный коэффициент экстинкции (C_{ext}) агрегатов ДНК-модифицированных золотых наночастиц был рассчитан для длины волны $\lambda = 520$ нм. Подобное поведение ожидалось в области $\lambda = 260$ нм. Однако расчет в этой области проведен не был, так как алгоритм вычисления не включал поглощения света молекулами ДНК.

Как известно, процесс гибридизации комплементарных нуклеотидных последовательностей сопровождается заметным понижением коэффициента экстинкции (гипохромный эффект) [448]. Однако вопрос о резонансном поглощении света ($\lambda \sim 260$ нм) нуклеиновыми кислотами, иммобилизованными золотыми частицами, в литературе практически не обсуждается. Не выяснено также, как влияет конформация поли(А), адсорбированной частицами КЗ, на оптические свойства системы маркеров КЗ-15-Т₂₈ (Т₂₈ — олиго(Т) длиной 28 нуклеотидов), в то время как физиологической и биохимической роли третичной структуры поли(А) сегментов про-мРНК в последнее время уделяется очень большое внимание [449]. Наш интерес к обсуждаемой проблеме усиливает способность гомополимерных нуклеиновых кислот, в частности, поли(А), гибридизованной с поли(Т), образовывать тройные спирали [450].

Общую схему получения ДНК-функционализированных КЗ маркеров можно представить следующим образом:

- приготовление КЗ;
- активация сульфгидрильных групп олигонуклеотидов (ОлН);
- очистка активированных ОлН;

смешивание SH-ОлН с КЗ, инкубация;
ступенчатое повышение ионной силы;
освобождение от избытка зонда;
концентрирование ОлН;

Для получения ДНК-функционализированных КЗ маркеров с монотиололигонуклеотидами используют золотые золи с частицами небольших размеров, как правило, 13–15 нм. Нам удалось стабилизировать золи с частицами 30–35 нм. В любом случае, это были золи, получаемые цитратным восстановлением.

Коммерческие препараты тииолигонуклеотидов имеют защитную третилловую (трифенилметилловую) группировку (Tr), для отщепления которой и активации HS-групп используют обработку водным раствором нитрата серебра.

В работе [451] с использованием метода, основанного на измерении флуоресценции, определено число тиол-модифицированных одонитевых олигонуклеотидов, иммобилизованных на золотых наночастицах, и степень их гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами в растворе. Плотность посадки гексантиол 12-мерных олигонуклеотидов на золотые наночастицы (34 ± 1 пмоль/см²) оказалась существенно выше, чем на плоскую золотую тонкую пленку (18 ± 3 пмоль/см²). При этом процент гибридизованных нитей на Au наночастицах ($1,3 \pm 0,3$ пмоль/см², 4%) был ниже, чем для золотых пленок (6 ± 2 пмоль/см², 33%). Ступенчатое повышение концентрации электролита в процессе прикрепления олигонуклеотидов существенно увеличивало поверхностное покрытие и, как следствие, агрегационную стабильность частиц. Кроме того, спейсерные последовательности олигонуклеотида улучшают эффективность гибридизации олигонуклеотид-модифицированных наночастиц от ~4 до 44 %. Поверхностная плотность посадки распознаваемых цепей может быть оценена с использованием коадсорбирующихся олигонуклеотидов растворителя. Это дает средство непрямого контроля среднего числа гибридизованных цепей, приходящихся на 1 золотую частицу.

Количество молекул олигонуклеотидов, иммобилизованных частицами КЗ, определяли также в работах [452] методом поли-

меразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ ПЦР) и [453] с помощью рентгеновской фотоэлектронной и FTIR спектроскопии. Результаты этих работ хорошо согласуются между собой.

В наших экспериментах коллоидное золото получали по методу Френса [57], восстановлением 50 мл 0,01% (0,294 мМ) водного раствора ЗХВК добавлением 1,5 мл 1% (38,8 мМ) Na_3Cit при кипячении. Конечная концентрация частиц КЗ-15, получаемого таким образом, при среднем диаметре ~ 15 нм составляет $\sim 3,25$ нМ ($1,85 \cdot 10^{12}$ мл $^{-1}$) по аналогии с [446].

Конъюгирование КЗ с тиюлигонуклеотидами осуществляли в соответствии с [4, 446, 452] при незначительных модификациях. Третиловые защитные группы снимали нитратом серебра. Для этого лиофильно высушенный препарат Tr-S-T₂₈ (10 ОЕ₂₆₀ × мл $^{-1}$) растворяли в 200 мкл тридистиллированной воды, добавляли 20 мкл 0,1 М AgNO_3 , и, после инкубации при комнатной температуре в течение 45 мин, наносили на хроматографическую колонку с носителем Biogel P-6 (Bio-rad, США), уравновешенную водой. Контроль элюции проводили с помощью UVcord (Farmasea, Швеция) с УФ фильтром $\lambda = 254$ нм.

Элюат в объеме 1 мл (~ 7 ОЕ₂₆₀ × мл $^{-1}$) смешивали с 10 мл КЗ-15 и инкубировали при 50°C сутки. Затем добавляли фосфатный буфер (0,2 М рН 7) до 10 мМ и NaCl (3 М) до 0,1 М и инкубировали еще сутки при 50°C. Затем повышали концентрацию NaCl до 0,3 М и продолжали инкубацию при той же температуре 2 суток. Препарат осаждали центрифугированием в пробирках “эппендорф” при 15000 g 20 мин и ресуспендировали в исходном объеме 0,01 М фосфатного буфера, содержащего 0,1 М NaCl и 0,02 М NaN_3 (буфер хранения). В дальнейшем использовали такой же буфер без NaN_3 (гибридизационный буфер). Препараты поли(А) и полиуридина (поли(У)) по 1 мг растворяли в 1 мл воды, осветляли центрифугированием при 15000 g 10 мин. Супернатанты разливали по аликвотам (50 мкл) и хранили до использования при -20°C.

Препарат Tr-S-5'T₂₈ очень хорошо растворяется в воде и практически прозрачен. После добавления AgNO_3 раствор мутнеет. Заметим, что AgNO_3 берется в большом (примерно 50-

кратном) избытке против Tr-S-T₂₈. Если даже раствор зонда освещен центрифугированием или микрофльтрацией, при смешении активированного зонда и КЗ раствор слегка мутнеет, по-видимому, вследствие образования коллоидного хлористого серебра.

В данной работе для обессоливания раствора зонда использовали гель-проникающую хроматографию. После очистки раствор был полностью прозрачным, и при объединении с раствором КЗ никаких визуально регистрируемых изменений не происходило. Также не было заметных изменений при добавлении фосфатного буфера и соли.

При центрифугировании готового маркера, что необходимо для освобождения от несвязавшегося зонда, образуется темно-красный маслянистый осадок и бледно-розовый супернатант. Осадок ресуспендируется при легком встряхивании, что говорит о высокой агрегативной устойчивости препарата.

На рисунке 4.17 приведены спектры поглощения света для исходного золя КЗ (1), смеси КЗ с зондом (2) и той же смеси после добавления буфера и повышения концентрации NaCl до 0,3 М (3). Все эти кривые даны с учетом изменения концентрации при разведениях, обусловленных внесением в систему растворов зонда, буфера и соли (т.е. приведены к концентрации исходного золя КЗ). Цифрой 4 обозначен спектр супернатанта, полученный после центрифугирования маркера (15000 *g*, 20 мин).

Дифференциальный спектр 5 получен вычитанием значений спектральной функции супернатанта $A(\lambda)_4$ из спектра маркера $A(\lambda)_3$ в буфере с 0,3 М NaCl. Здесь нижними индексами обозначены номера соответствующих кривых. Поскольку спектр 5 был определен указанной математической обработкой, мы для краткости будем ссылаться на него как на "виртуальный" спектр маркера. Реальный спектр маркера КЗ-15-T₂₈, полученного после ресуспендирования осадка в том же объеме гибридизационного буфера, показан кривой 6. Можно видеть, что кривая реального спектра маркера КЗ-15-T₂₈(6) проходит значительно ниже кривой виртуального спектра (5). Тем не менее, в области ППР она проходит выше кривой спектра исходного золя (1).

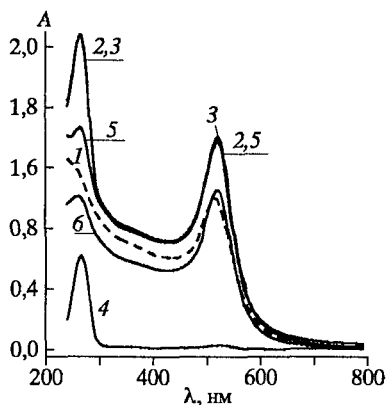


Рис. 4.17. Эволюция спектров поглощения КЗ в процессе приготовления маркера КЗ-15-Т₂₈. 1 — исходный золь КЗ-15, 2 — спектр смеси КЗ-15+Т₂₈, 3 — спектр системы после добавления фосфатного буфера и NaCl до 0,3 М, 4 — супернатант, 5 — виртуальный спектр маркера, 6 — реальный спектр маркера КЗ-15-Т₂₈ после ресуспендирования в буфере (фосфатный буфер+0,1М NaCl). Спектр 3 получен через 48 часов после начала процедуры синтеза, включающей 24 часа инкубации смеси КЗ-15+ Т₂₈ и 24 инкубации системы после добавления фосфатного буфера и 0,1М NaCl

Спектрофотометрический контроль процесса приготовления препаратов тимолигонуклеотид-функционализированного КЗ был использован нами с целью определения плотности посадки биомакромолекул на частицы металла.

По литературным данным, эта величина для частиц золота 13–15 нм составляет ~160 ДНК зондов на частицу (34 пМ·см⁻²) [451] или 200 ДНК зондов на частицу (50 пМ·см⁻²) [452]. Эти данные были получены с помощью флуориметрии и ОТ ПЦР.

Построение изотермы адсорбции в нашей постановке эксперимента не представлялось возможным, поэтому мы ограничились анализом содержания олигонуклеотидов в смеси КЗ с HS-Т₂₈ и супернатанте после центрифугирования. Для оптического “взвешивания” адсорбированного полимера необходимо, чтобы светопоглощение адсорбата и адсорбента были взаимно независимы. По нашим данным, если принять в расчет эксперимен-

тальный инкремент поглощения, синтезированные частицы маркера содержат на поверхности порядка 150 молекул.

Таким образом, процедура получения олигонуклеотид-функционализированного КЗ, подробно описанная выше, позволяет получать препараты КЗ маркеров, агрегационно стабильные в водно-солевых растворах [454]. Устойчивость маркеров КЗ-15-Т₂₈ сохраняется высокой в широком диапазоне температур (от -70° до $+80^{\circ}\text{C}$) и при многократном замораживании-оттаивании. Основным отличием полученного нами препарата от описанного в патенте [446] является то, что нами использованы зонды Т₂₈, тиолированные непосредственно по 5'-тимидину без применения алканового спейсера. Подобный подход совсем недавно был использован авторами [455] для прямой "пришивки" двухцепочечных ДНК к золотым поверхностям.

В заключении к данной главе хочется отметить, что среди способов "посадки" зондов на метки выделяют два основных: адсорбционный и хемосорбционный, каждый из которых имеет свои особенности в приготовлении и использовании. К преимуществам простой (физической) адсорбции относят минимальное воздействие на структуру макромолекулы, и, как следствие, сохранение ее функциональных свойств. Величина адсорбции, а также структура адсорбционного полимерного слоя в значительной мере определяются характером взаимодействия макромолекул с поверхностью, т.е. типом адсорбционной связи.

Оптимальное соотношение компонентов определяется в экспериментах по флокуляции золей электролитами. Добавление электролитов в гидрозоль золотых или серебряных наночастиц вызывает их агрегацию как результат экранирования заряда двойного электрического слоя, в норме (в водной среде) выполняющего стабилизирующую функцию.

Полимеры, содержащие как кислотные, так и основные группы (т.е. полиамфолиты или слабоосновные поликатионные макромолекулы с рН-зависимым защитным действием), являются наиболее эффективным средством стабилизации анионных гидрозолей золота.

Оптимальные для стабилизации условия обычно достигаются при возможно более низкой ионной силе и при значениях рН

на $\sim 0,5$ ед. выше изоэлектрической точки стабилизирующего вещества.

Адсорбция полимера приводит к изменению геометрических и диэлектрических параметров вблизи поверхности коллоидных частиц и, соответственно, к изменению их оптических свойств.

Формирование вторичной неоднородной оболочки практически незаметно при измерениях спектров экстинкции, но становится вполне детектируемым по изменениям спектров упругого рассеяния света. Это свидетельствует о потенциально большей чувствительности метода ДССР по сравнению с обычной спектроскопией поглощения. Результаты нашей работы позволяют также предположить, что метод ДССР также имеет хорошую перспективу в качестве альтернативы дорогим сенсорам, основанным на изменении оптических свойств призм или зеркал при адсорбции на них биологических макромолекул.

Другой подход к функционализации наночастиц основан на использовании тиольных или дисульфидных и фосфиновых лигандов, содержащих терминальную карбокси-, amino- или малеимидо-группы. Такой подход позволяет связывать биологические компоненты карбодиимид опосредованной этерификацией и амидированием или реакцией с тиольной группой. Преимущества химического прикрепления наиболее ярко проявляются для линейных молекул, подобных ДНК, и связаны с терминальной иммобилизацией, обеспечивающей строгую пространственную ориентацию зондов.

Использование описанной процедуры приготовления олигонуклеотид-функционализированного КЗ позволяет получать агрегационно стабильные в водно-солевых растворах препараты КЗ маркеров. Устойчивость маркеров КЗ-15-Т₂₈ сохраняется высокой в широком диапазоне температур (от -70° до $+80^\circ\text{C}$) и при многократном замораживании-оттаивании.

Спектрофотометрические исследования позволили установить, что поглощение нуклеиновых кислот, иммобилизованных на частицах КЗ, и самого КЗ складывается не аддитивно как в зоне поглощения НК (260 нм), так и в области ППП коллоидного золота (520 нм). Количество молекул олигонуклеотидов, иммобилизованных на частицах КЗ, определенное спектрофотометрическим способом, по порядку величины совпадает с данными других авторов.

5. ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА В МИКРОСКОПИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

5.1. Электронно-микроскопические исследования

Основным методом детектирования биоспецифических взаимодействий посредством коллоидно-золотых частиц долгое время (с 1971 г. [3]) оставалась электронная микроскопия, преимущественно в просвечивающем варианте. Несмотря на способность золотых наночастиц интенсивно рассеивать и излучать вторичные электроны, они не нашли пока столь же широкого распространения в варианте сканирующей электронной микроскопии.

Метки разных размеров и зонды в широком ассортименте определяют основное преимущество коллоидно-золотых маркеров в цито- и гистохимии, как традиционной, так и электронно-микроскопической (которую называли просто электронной до эры всеобщей компьютеризации). Использование термина метка (label) и производных от него (labeling, etc.) в отношении золотой наночастицы оказалось прерогативой гисто- и цитологии.

Обладая набором общих для маркеров требований (чувствительность, селективность, стабильность) частицы КЗ имеют размеры сравнимые с биомакромолекулами. Это накладывает ограничения на применение КЗ с точки зрения его проникаемости в ткани. В настоящее время данная проблема решается с применением золотоорганического комплекса, содержащего 11 атомов металла в кластере [20], которые так и называют — *undecagold clusters*. Диаметр таких меток составляет около 1 нм. Однако визуализировать их удобно только с помощью просвечивающе-

го электронного микроскопа. В технике микроскопических заливок проблему проницаемости решают применением водорастворимых метилметакрилатных смол, полимеризующихся при низких температурах под действием УФ света или криоультратомии [58, 61].

В большом числе публикаций, отражающих ЭМ исследования, проводимые с использованием КЗ, только в их относительно малой доле приводится достаточно подробное техническое описание пробоподготовки и визуализации [61, 165]. ЭМ снимки являются основным документом, подтверждающим истинные размеры КЗ, и (в некоторых случаях) геометрические параметры покрывающих биополимерных слоев [86]. Особенности современного этапа использования ЭМ техники является применение приборов высокого разрешения (high-resolution transmission electron microscope (HRTEM)) и систем цифровой записи и обработки изображений. Высокое приборное разрешение, в свою очередь, обусловлено применением автоэмиссионных катодов и электронных пушек с ускоряющим напряжением 200 кВ [86]. Все это вместе позволяет визуализировать тонкие слои ~ 2 нм на поверхности золотых частиц, не стабилизированных белком либо ПАВ, и предположительно представляющих собой слой восстановителя (цитрата) или его метаболитов [86].

Особенностью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) является возможность объемной визуализации объектов. До появления приборов для СЭМ, оборудованных поле-эмиссионными электронными пушками, ограниченное разрешение большинства микроскопов этого типа не позволяло визуализировать относительно мелкие частицы (например, КЗ с размером менее 15 нм). В связи с чем использовался режим изображений во вторичных электронах с применением маркеров с крупными частицами (вирусными, латексными и т.п.) [77]. Хорисбергер с соавт. в 1975 г. показали, что большие коллоидные золотые частицы с диаметром более 30 нм могут быть обнаружены в режиме вторичных электронов в обычных СЭМ [407].

Введение в обиход коммерчески доступной полевой эмиссии СЭМ (конец 70-х годов прошлого века) обеспечило намного меньший диаметр электронного луча с достаточной яркостью и

более высокое усиление, что технически разрешало обнаружение меньших по размеру коллоидных золотых частиц. Однако отличить их от соразмерных структур поверхностей объекта в режиме вторичных электронов было практически невозможно. Однозначное определение золотых частиц с размером вплоть до 5 нм обеспечило использование дополнительно сигнала рассеянных электронов [456, 457].

Следующим этапом в истории СЭМ стало появление приборов с высоким разрешением, "в линзе", полевой эмиссией, которые обеспечивают диаметр луча менее 1 нм при высоком ускоряющем напряжении [458]. В этих приборах объект помещается в полость полюсных наконечников высоко возбужденной конденсорно-объективной линзы. Электронная микроскопия этого типа в комбинации с очень эффективными детекторами рассеянных электронов позволила непосредственно обнаруживать ультрамалые золотые частицы размером вплоть до 1 нм [459–462]. В последние годы препараты КЗ активно используются также в различных вариантах атомно-силовой микроскопии [74, 463–465].

В плане пробоподготовки для ТЭМ за последние 30–40 лет ничего революционного не произошло. Для получения хорошего контраста требуются тонкие прочные подложки. Для этого используют "дырявые" формваровые (поливинилформальные) подложки и сеточки с мелкими ячейками ~ 300 меш. По нашим наблюдениям, хорошие результаты дают парлодиевые (нитроцеллюлозные) подложки, реже используемые в настоящее время. Они, конечно, менее прочные, чем формваровые, но, будучи лишь слегка укрепленными углеродом, остаются весьма прозрачными и не дрейфуют.

В наших работах электронно-микроскопические исследования использовались, прежде всего, для определения морфометрических параметров частиц КЗ, что было необходимо для их учета при теоретических расчетах спектров экстинкции и рассеяния гидрозолями КЗ. С этой целью строили гистограммы распределения частиц по размерам, оценивая не менее 300 частиц каждого препарата.

Препараты, нанесенные на парлодиевые подложки (укрепленные углеродом и гидрофилизированные поли-L-лизинном) просматривали на микроскопах JEM 100-CX (Jeol, Япония) или BS-500 (Tesla, Чехия).

Стандартная подготовка препаратов в наших экспериментах выглядит следующим образом:

Каплю суспензии наносили на пленку "Parafilm" в объеме 20 мкл. Сверху помещали подготовленную сетку с подложкой.

Инкубировали в течение 10–20 мин.

При низкой концентрации частиц использовали тепловое приклепление, удерживая сеточку пинцетом возле лампы накаливания, не допуская высыхания.

Удаляли излишек жидкости, прикасаясь сеточкой к полоске фильтровальной бумаги.

Промывали сеточку на капле тридистиллированной воды, высушивали и помещали в контейнер.

Типичное изображение частиц КЗ, получаемых по методу Френса, приведено на рисунке 5.1. Большое увеличение и хорошая контрастность изображения позволяют четко визуализировать границы объектов. Калибровку приборов по увеличению мы осуществляли по репликам с дифракционных решеток 1200 линий/мм. Поскольку используемые нами подложки отличались большой прозрачностью фона, для получения хорошего контраста и четкости изображений мы могли пользоваться самыми маленькими конденсорными и объективной диафрагмами, что, в свою очередь, обеспечивало нам максимальное разрешение. Интересно отметить, что образцы, подобные изображенным на рис. 5.1, можно использовать как тест-объекты для юстировки приборов по астигматизму, что гораздо удобнее, чем получение "дырчатых" подложек.

При изучении поверхностных структур бактериальных клеток приготовление препаратов проводилось по аналогичному протоколу в вариантах мечения непосредственно на сетке. Тогда, после этапа нанесения препарата включали дополнительные этапы блокировки мест неспецифической адсорбции 0,1% раствором БСА и инкубации на капле КЗ маркера. Альтернативно, мечение проводили в пробирках "Эппендорф" с отмывкой центрифугированием и последующим нанесением на сеточку. На

рисунке 5.2 приведена электронная микрофотография бактериальной клетки, меченой конъюгатом КЗ-15 со штаммоспецифичными АТ.

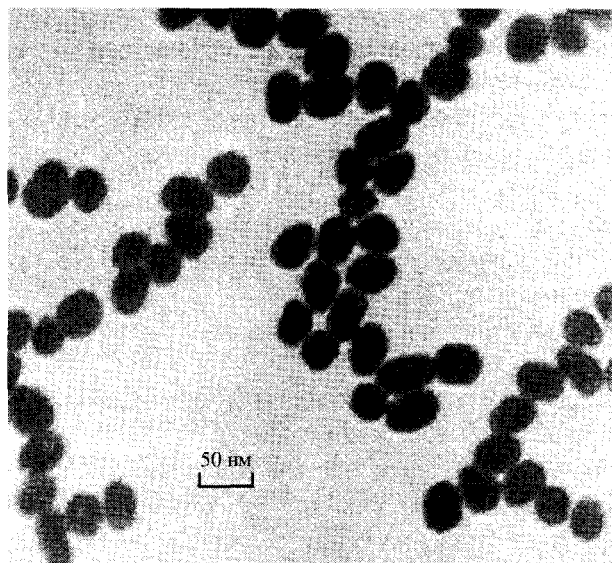


Рис. 5.1. Типичное электронно-микроскопическое изображение 40 нм частиц КЗ

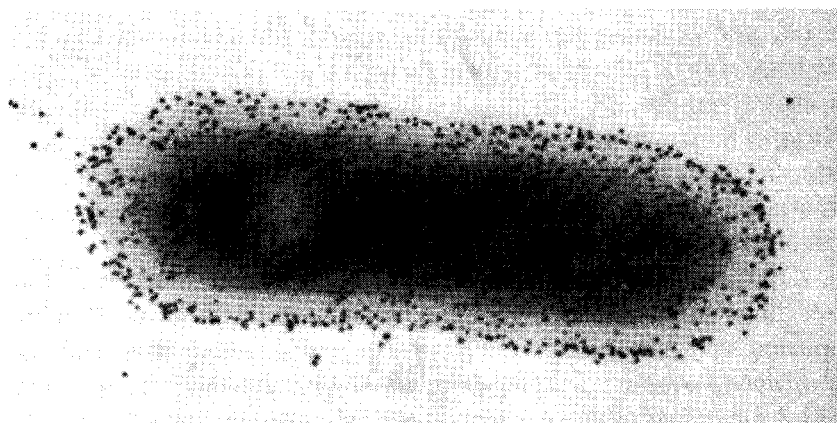


Рис. 5.2. Электронно-микроскопическая фотография бактериальной клетки, меченой конъюгатом КЗ-15 со штаммоспецифичными АТ

5.2. Светомикроскопические исследования

Принципы визуализации золотых наночастиц в световом микроскопе основаны на свойствах КЗ поглощать (просвечивающая) и рассеивать (темнопольная и эпиларизационная оптика) видимый свет [76]. Наиболее ярко светомикроскопические исследования стали проявляться в самое последнее время, что связано, с одной стороны, с развитием техники цифровой записи и обработки изображений, с другой — широким применением серебряных и композитных (сплавных) наноматериалов.

Одной из характерных работ данного направления является статья [139], в которой описывается использование темнопольного оптического микроскопа для демонстрации локализованного ППР (λ_{\max}), характеризующего оптический ответ индивидуальных серебряных наночастиц на образование монослоя небольших молекул адсорбата. Адсорбция менее чем 60 000 1-гексадекантиольных молекул на отдельную Ag наночастицу приводила к сдвигу λ_{\max} локализованного ППР на 40,7 нм. В этой работе также оценивались кинетические параметры ответа системы в сравнении с другими сенсорными технологиями реального времени.

В качестве объекта для микроскопических исследований мы использовали срезы каллусов табака (*Nicotiana rustica* L.). Подготовку образцов проводили согласно [67]. Ткань фиксировали в растворах 2,5% глутарового альдегида с 2% формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при -20°C , после чего заливали в ПЭГ-1500. Срезы получали с использованием микротомы MC-2 (Россия). На прикрепленные к предметному стеклу срезы на 30 мин помещали каплю блокирующего буфера (1% БСА, 0,02% Твин-20, 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8,2), затем срез инкубировали в течение 15 мин в растворе маркера фаллоидин-КЗ, разведенного до $A_{520} = 0,1$, после чего отмывали в том же буфере. После окрашивания проводили процедуру усиления солями серебра. Для светомикроскопических исследований использовали микроскоп "Jenaval" (Германия) в просвечивающем варианте наблюдения с объективом HI 100x с по-

следующим фотографированием с помощью микрофотонасадки mf-AKS.

В результате исследований, проведенных на полутонких срезах каллусных тканей табака, заключенных в ПЭГ, выяснилось, что маркеры на основе конъюгатов биоспецифических молекул с КЗ можно успешно применять и для изучения растительного цитоскелета с помощью световой микроскопии (рис. 5.3). С применением маркера фаллоидин-КЗ и последующего усиления солями серебра можно локализовать актин-содержащие структуры клеток. На рис. 5.3 стрелками показаны зоны локализации актиновой составляющей цитоскелета растительной клетки, локализованной в субкортикальной и околоядерной областях, выявленной по этой методике.



Рис. 5.3. Светомикроскопическое выявление актин-содержащих структур на полутонком срезе каллусной ткани табака маркером фаллоидин-КЗ с последующим усилением солями серебра (масштабная линейка 10 мкм)

5.3. Темнопольная визуализация наночастиц

Золотые и серебряные наночастицы (в особенности наностержни) имеют большие возможности для выявления биоспецифических взаимодействий на уровне световой микроскопии темного поля по сравнению с флуоресцентными метками или даже сферическими частицами. В 2005 г. была опубликована работа [254], в которой золотые наностержни рассматриваются как несовершенные поляризаторы. Однако, по нашему мнению, аperiодическое “вспыхивание” плазмонно-резонансных наностержней, обусловленное вращательным броуновским движением, связано в большей степени с переориентацией частиц относительно облучающего светового потока.

В наших экспериментах мы использовали систему темнопольного освещения сверху (объектив $\times 40$ с опак-иллюминатором), реализованную на базе микроскопа “Биолам М” (ЛОМО, Россия). Регистрацию изображения проводили с помощью цифровой фотокамеры “Olympus C 765” в режиме скоростной съемки (15 кадров/сек).

На рис. 5.4 приведен ряд последовательных кадров с одного участка изображения препарата золотых наносфер с размерами частиц 90 нм в 50% растворе глицерина. Для лучшей демонстрации перемещения частиц приведен каждый второй кадр, т.е. рисунок отображает картинку с временным интервалом около 6 сек. Аналогичный препарат золотосеребряных наностержней с размерами $\sim 15 \times 40$ нм показан на рис. 5.5. В данном случае мы наблюдаем совершенно иную динамику видеоизображения. Наряду с перемещением объекта в поле зрения, отчетливо видно изменение интенсивности его свечения, обусловленное вращательной диффузией частиц (рис. 5.6).

На рис. 5.6 приведены диаграммы кинетики свечения одной частицы КЗ-90 (а) и наностержней 15×40 нм (б), полученные с каждого последовательного кадра видеофайла (аналогично рис. 5.4, 5.5). В действительности — это интенсивность наиболее ярких пикселей изображений (высчитывать интегральную светимость пятен мы пока не умеем). Однако файлы обработ-

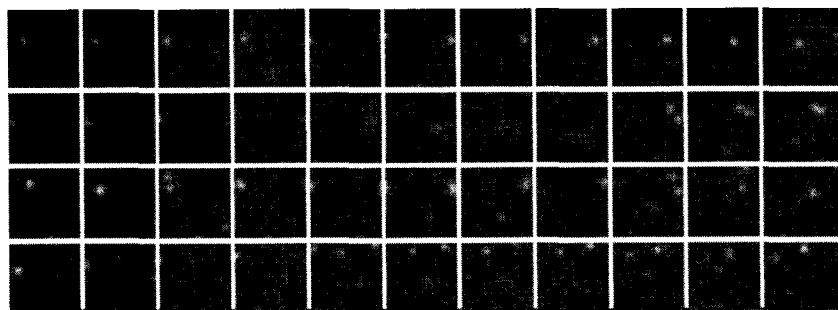


Рис. 5.4. Серия последовательных кадров участка изображения препарата частиц золотых наносфер диаметром 90 нм в 50 % глицерине. Временной интервал с 1 по 48 кадр — 6,4 сек. Световая микроскопия темного поля (объектив с опак-иллюминатором $\times 40$)

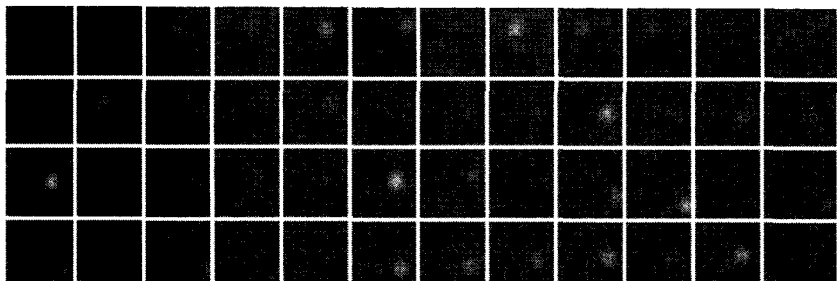


Рис. 5.5. Серия последовательных кадров участка изображения препарата частиц золотосеребряных наностержней с размерами $\sim 15 \times 40$ нм в 50 % глицерине. Временной интервал с 1 по 48 кадр — 6,4 сек. Световая микроскопия темного поля (объектив с опак-иллюминатором $\times 40$)

ки данных содержат информацию о координатах этих пикселей. Также у нас имеются изображения тестовых объектов (объект-микрометров), что позволяет перевести изображения в координаты реальных расстояний.

Мы полагаем, что яркие вспышки соответствуют переориентации частиц по отношению к падающему свету, а не их уходу из плоскости фокуса. Чтобы доказать это, на рис. 5.6 приведены временные зависимости рассеянной интенсивности для единичного наностержня и для единичной наносферы 90 нм. Размер

сферических частиц выбран так, что их коэффициент трансляционной диффузии близок к таковому для стержней, а яркость рассеянного света позволяет четко регистрировать частицу в темном поле микроскопа. Из сравнения рис. 5.6 *а, б* видно, что в случае наностержней частота изменения интенсивности рассеяния существенно превосходит таковую для сфер, что связано с проявлением эффекта вращательной диффузии наностержней.

Как отмечалось выше, наностержни получают в концентрированных растворах ионных ПАВ. Отмыть двойной слой ПАВ с поверхности частиц практически невозможно, его можно только заместить на лиганды, имеющие большую, чем четвертичные амины, аффинность к поверхности золотой или серебряной наночастицы (например, содержащие меркапто-группы). Однако, эта особенность металлически мицеллярных структур, по всей видимости, может облегчить адсорбцию биомакромолекул, плохо растворимых в условиях низкой ионной силы (таких как миозины, мембранные амфифильные белки и липопротейны), по аналогии с обращенно-фазовой хроматографией белков [466]. Сведений о такого рода функционализации пока нет. Однако нам удалось получить некоторые обнадеживающие экспериментальные результаты.

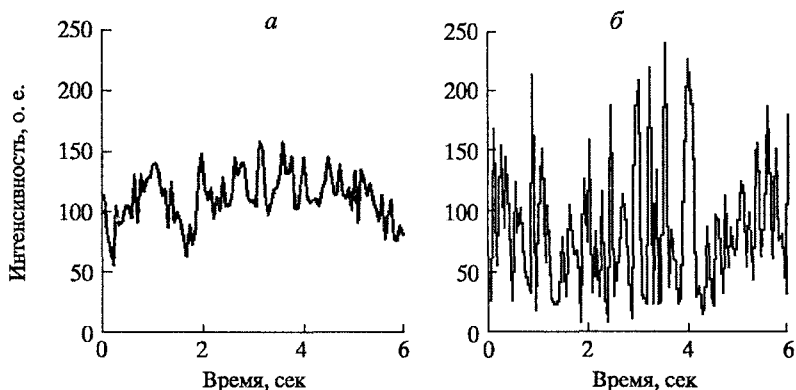


Рис. 5.6. Кинетика интенсивности свечения золотых наносфер 90 нм (*а*) и золотосеребряных наностержней $\sim 15 \times 40$ нм (*б*)

Так препарат наностержней после аккуратной отмывки в цикле седиментационного осаждения был напрямую конъюгирован с протеином А. После освобождения от избытка белка центрифугированием препарат показал специфическое связывание с IgG человека, выявляемое в дот-блот тесте.

Учитывая уникальные оптические свойства золотых, серебряных и сплавных наностержней, можно предположить, что эти частицы в ближайшее время найдут широкое применение в изучении таких сложных комплексных систем биоспецифических молекулярных взаимодействий, как цитоскелет и другие элементы внутриклеточной подвижности. Предпосылками к тому являются открытия недавнего времени, подтверждающие наличие систем актин-миозинового и кинезин- или динеин-тубулинового взаимодействия во всех типах эу- и прокариотических клеток, включая митохондрии и хлоропласты [467]. Кроме того, амфифильность и стереометрические характеристики миозинов и кинезинов создают хорошие предпосылки для функционализации этими молекулами металлических наностержней, стабилизированных ионными ПАВ.

6. ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЪЮГАТОВ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА

6.1. Обзор современных методик твердофазного иммуноанализа на мембранных носителях

6.1.1. Дот-блот анализ: принципы и применение

На ранних этапах развития иммуноанализа предпочтение отдавалось *жидкофазным* методикам, в которых связавшиеся АГ осаждали (например, с помощью вторичных АТ) или несвязавшийся АГ удаляли адсорбцией с помощью активированного угля, покрытого декстраном. В настоящее время наиболее распространены *твердофазные* методики (впервые использованные для радиоиммуноанализа белков [468]), поскольку они позволяют существенно упростить проведение эксперимента и уменьшить фоновый сигнал.

Для осуществления жидкофазного анализа необходимо получить раствор АГ. Наряду с водорастворимыми, существует большое количество АГ, которые можно перевести в растворимое состояние только с помощью диссоциирующих агентов: додецилсульфата натрия, мочевины, гуанидин хлорида и др. К ним следует добавить также и широкий класс корпускулярных АГ, например, таких, как целая бактериальная клетка. Перечисленные диссоциирующие добавки препятствуют образованию иммунных комплексов [469]. Избежать подобных затруднений позволяет техника проведения анализа с АГ, иммобилизованными на твердых носителях.

Известны следующие типы носителей для ковалентного или адсорбционного связывания АГ [2]:

трубки (например, стеклянные, полистирольные, полипропиленовые);
гранулы (например, активированного полистирола);
мелкие частицы (например, полиакриламида, целлолозы, сефарозы);
микропланшеты или полоски (например, полистирольные);
дипстики, карточки, стержни (например, поливинилхлоридные);
электроды (например, платиновые, углеродные);
пленки или волокна (например, стеклянные, кварцевые);
мембраны (например, нитроцеллюлозные).

Однако, наибольшую популярность в практическом иммуноанализе приобрели микропланшеты и мембраны. Для того, чтобы выбранный носитель можно было использовать в иммуноанализе, он должен удовлетворять следующим требованиям: обладать высокой связывающей способностью по отношению к иммобилизуемому реагенту;
иметь высокую сорбционную емкость (количество АГ, способное связаться на единице площади носителя);
обеспечивать достаточную устойчивость к десорбции реагента;
иметь низкий уровень неспецифического связывания;
обладать воспроизводимыми свойствами и характеристиками.

Методы с использованием микропланшетов наибольшее распространение получили в твердофазном варианте ИФА — ELISA [470]. ELISA является наиболее популярным методом при диагностике различных вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных болезней человека и животных. В ELISA используются конъюгаты АТ с ферментами, обычно с пероксидазой или щелочной фосфатазой, реагирующими с соответствующими хромогенными субстратами с образованием окрашенного соединения, количество которого можно определить спектрофотометрически. Этот метод пригоден для определения АТ или АГ с двумя эпитопами; он менее трудоемок и менее продолжителен по сравнению с другими ранее применявшимися методами, такими, как реакция связывания комплемента, непрямая гемагглютинация и иммунофлуоресценция. Кроме того, ELISA очень удобен для выполнения большого числа однотипных анализов и

поэтому принят во многих научно-исследовательских и клинических лабораториях. Однако ELISA имеет ряд недостатков.

Высокую точность измерений обеспечивают только специальные анализаторы, поэтому ELISA применяется в основном в лабораториях. Кроме того, свойства микротитровальных планшетов, используемых для анализа, изменяются от партии к партии, от планшета к планшету и даже от лунки к лунке (так называемый, краевой эффект) [471, 472].

В последнее время наблюдается тенденция к снижению стоимости медицинского обслуживания. В связи с этим среди клиницистов наибольшую популярность приобретают простые методы анализа, не требующие дорогостоящего оборудования. Метод ELISA также претерпел изменения, стал более надежным, более простым в исполнении и приемлемым по цене. В модифицированном варианте для адсорбции различных АГ вместо внутренних поверхностей лунок микротитровальных планшетов, на которых не очень эффективно связываются белки, используют нитроцеллюлозные фильтры [473] (а в последние годы — силиконизированные матрицы [474]). Такую модификацию называют dot- или spot-ELISA (точечный твердофазный иммуноферментный анализ). В dot-ELISA минимальные объемы растворов АГ или АТ наносят на нитроцеллюлозную или подобную подложку в виде серии точек, что позволяет выполнить гораздо большее число анализов с тем же количеством реагентов. Преципитирующие хромогенные субстраты, обычно применяемые в иммуноблоттинге [475, 476], на белом нитроцеллюлозном фильтре образуют легко различимые цветные пятна, в результате чего отпадает нужда в дорогих фотометрах. Белый цвет подложки вокруг пятен помогает контролировать реакции неспецифического связывания. Мембраны с результатами анализа могут храниться в темноте в течение многих лет без потери окраски. Кроме того, простота и экономичность в отношении расхода АГ и реагентов позволяют осуществлять анализы типа dot-ELISA за пределами лаборатории, например, в домашних или полевых условиях [477].

В dot-ELISA можно применять различные препараты АГ. Так, на нитроцеллюлозных мембранах можно сорбировать как

жизнеспособные [478] или фиксированные формалином клетки простейших [479], так и супернатанты, полученные после разрушения клеток ультразвуком или замораживанием-оттаиванием [480]. С нитроцеллюлозными мембранами можно связывать этанольные экстракты бактериальных препаратов [481] и целые бактериальные клетки [482–486]. Кроме того, этот метод применяется для анализа синтезированных непосредственно на НЦ пептидов [487].

В соответствии с тем, в каком виде антигенный материал иммобилизуют на мембране, различают иммунодот- и иммуноблот-методы. С помощью иммунодот-метода анализируют нефракционированные образцы или наносят фракции в виде отдельных проб, которые за счет вертикальной диффузии сорбируются в слое пористого мембранного носителя [488]. В отличие от этого, при использовании иммуноблот-метода образец всегда сначала фракционируют, а затем все фракции одновременно переносят на мембрану [489]. Обработка фильтров с адсорбированными АГ в обоих методах идентична: сначала проводят блокирование сайтов связывания, оставшихся свободными на мембране, а затем осуществляют визуализацию продуктов реакции с помощью иммунохимического маркера.

В качестве сорбентов для твердофазного мембранного иммуноанализа были испытаны различные материалы: диазобензилоксиметил-, диазофенилтиоэфир-, ацетат-целлюлоза, нейлон, капрон, поливинилдендифторид (ПВДФ), диазо- и CNBr-активированная бумага и др. [490]. Наибольшее распространение получила НЦ и ее модификации [491]. Сорбция белков или других исследуемых веществ на ней происходит в основном за счет электростатических взаимодействий [492]. Для низкомолекулярных АГ предложены методы ковалентной иммобилизации [493, 494]. Нанесение исследуемого материала на мембрану в случае дот-анализа осуществляется, как правило, в центр очерченного квадрата 5×5 мм. Кроме того, для сорбции материала с низкой концентрацией АГ применяют микрофилтраторы. Перенос фракций с гелей на НЦ осуществляют пассивно путем диффузии или активно — под действием капиллярных сил, вакуума или электрического поля [469, 491, 495, 496].

Немаловажно, что на НЦ можно наносить материал в растворах, содержащих додецилсульфат (до 2%), мочевины (до 8 М), сильные электролиты (до 2 М), меркаптоэтанол (до 5%), глицерин (до 20%) [469].

Для блокирования мест неспецифической адсорбции мембраны обрабатывают растворами иммуноинертных белков или синтетических полимеров. Наиболее часто для этой цели используют растворы обезжиренного молока, БСА, желатины, ПЭГ, поливинилпирролидона, Tween-20 [469, 491].

Кроме иммуноспецифического существует и неспецифический метод окрашивания препаратов на мембранах. Для неспецифической окраски перенесенного материала на мембране используют индийские чернила, амидочерный, кумасси бриллиантовый синий, анилиновый голубой, нафталиновый черный, прочный зеленый, толуидиновый синий, соли серебра, хелаты металлов, Ponceau S, "StainsAll" и др. красители [497, 498]. Для специфической детекции АГ применяют радиоактивные, ферментные, флуоресцентные и хемилюминесцентные метки. Для увеличения чувствительности используют системы авидин-биотин и дигоксин-антидигоксин [499, 500].

В мембранных тестах традиционно выявляют белки (Western blotting) [489, 491, 501], а также ДНК (Southern blotting) [502] и РНК (Northern blotting) [503]. Обширную информацию о дот-блот методах иммуноанализа можно найти в книгах и обзорах [2, 469, 491, 504].

6.1.2. Коллоидное золото в твердофазных методах анализа

Как упоминалось выше, в качестве метки в мембранных тестах широко применяют радиоактивные изотопы (^{125}I , ^{14}C , ^3H) и ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу и др.) [505–507]. В 1984 г. вышли четыре независимые работы [508–511], в которых в качестве метки для твердофазного иммуноанализа было предложено использовать КЗ. Использование конъюгатов КЗ в методах твердофазного анализа основано на том, что ин-

тенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяет визуально определять результаты реакции, проведенной на твердом носителе [512–514].

Для неспецифического выявления белков на НЦ был предложен “золотой краситель” (AuroDye) [515, 516]. В дальнейшем метод был развит и модифицирован [517–519]. Золотой краситель представляет собой золь золота, частично стабилизированный полимерами типа ПЭГ 20М, Tween-20 и др., который в кислой среде обладает способностью неспецифически связываться с биомакромолекулами за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также за счет ионных взаимодействий с тиоловыми и свободными аминогруппами основных белков стабилизирующих полимеров. Метод неспецифического окрашивания золотым красителем достаточно прост, удобен и обладает высокой чувствительностью [520] (табл. 6.1). Интенсивность окрашивания пропорциональна логарифму концентрации белка и его молекулярной массе [521]. В работе [522] предложен метод элюции связавшегося с КЗ белка и фотометрического определения концентрации белка по измерению поглощения образовавшегося комплекса при $\lambda = 540$ нм.

AuroDye использовали также для непосредственной окраски белков в геле [523], для выявления на блоте нуклеиновых кислот [524], в электронной микроскопии [525, 526].

При специфическом окрашивании мембрану с напеченным исследуемым материалом инкубируют в растворе АТ (или других биоспецифических зондов), меченных КЗ. В качестве зондов при проведении “золотого” дот- или блот-анализа используют Ig [509, 511, 527, 528], Fab- и scFv-фрагменты антител [198, 529], белок А [508, 510], лектины [530, 531], ферменты [524], стрептавидин или антибиотинные АТ при исследовании биотинилированных образцов [532, 533] и др. Используют также одновременно несколько меток (например КЗ и пероксидазу [534, 535] или щелочную фосфатазу [536]) для выявления различных АГ на мембране. Конъюгаты КЗ применяют также в тканевом блоте [537], когда на НЦ наносят отпечаток ткани и с помощью меченых зондов выявляют расположение искомым компонентов, в линейном блоте [538].

Таблица 6.1

Характеристики красителей для неспецифической окраски белковых блотов

Способ окраски	Чувствительность	Окрашивание
Ponceau S	1-2 мкг	обратимое
Amido black	1,5 мкг	постоянное, низкий фон
Comassie blue	1,5 мкг	постоянное, высокий фон
India ink	100 нг	постоянное
Colloidal gold	3 нг	постоянное

КЗ в мембранных тестах применяли для диагностики паразитарных [539–542], вирусных [543–546], грибковых [547, 548] заболеваний, туберкулеза [549], мелиоидоза [550], сифилиса [551], бруцеллеза [552], шигеллеза [553], ранних сроков беременности [554], определения групп крови [555], дот-блот гибридизации [556]. Предпринимались попытки, правда, на наш взгляд, не вполне убедительные, использовать окрашивание препаратами КЗ образцов в лунках микротитровальных планшетов [557–561], на поверхности покровного стекла [562], а также применять вместо КЗ в твердофазном иммуноанализе коллоидное серебро [563] или угольные частицы [564]. Более перспективным кажется употребление КЗ для анализа больших массивов АГ в микроматрицах (иммуночипах) [565], что позволяет определять анализируемое вещество в концентрации 60–70 нг/л. При этом используются микролитровые количества аналита и детектирующего иммунозолотого маркера, а проанализировать одномоментно можно до 384 проб.

В 90-х годах прошлого века рядом зарубежных фирм был организован выпуск иммунохимических тест-систем для бесприборной диагностики. Благодаря высокой специфичности и чувствительности иммуноанализа эти тесты нашли широкое применение в определении наркотических соединений, токсинов, ранней диагностики беременности, скрининге особо опасных инфекций и урогенитальных заболеваний [566–573]. Разрабатываются методы для диагностики туберкулеза [574], ДНК-гибридизации [438]. Наиболее интенсивно разрабатываемым и широко внедряемым в практику форматом экспрессных иммунотестов является *иммунохроматография*.

Иммунохроматографический анализ основан на движении элюента вдоль мембраны (латеральная диффузия), которое приводит к образованию специфических иммунных комплексов на разных участках мембраны, визуализируемых как окрашенные полосы [575]. В качестве меток в данных системах используют ферменты, окрашенные латексы, но в подавляющем большинстве случаев — КЗ [576–578].

Исследуемый образец за счет капиллярных сил мигрирует вдоль тест-полоски. При наличии в пробе искомого вещества или иммунохимически близких соединений в момент прохождения образца через абсорбирующее устройство происходит реакция со специфическими АГ, мечеными КЗ, которая сопровождается образованием комплекса АГ–АТ. Коллоидный препарат вступает в реакцию конкурентного связывания с АГ, иммобилизованным в тест-зоне (как правило, при детекции низкомолекулярных соединений для иммобилизации используется конъюгат гаптена с белковым носителем). Если концентрация АГ в пробе превышает пороговый уровень, конъюгат не обладает свободными валентностями для взаимодействия в тест-зоне и окрашенная полоса, соответствующая образованию комплекса, не выявляется. При отсутствии в пробе определяемого вещества или в случае, если его концентрация меньше порогового уровня, АГ, иммобилизованный в тест-зоне полоски, вступает в реакцию с АТ на поверхности КЗ, что приводит к проявлению окрашенной полосы.

Золотые частицы с иммобилизованными АГ, непрореагировавшие с АГ в тест-зоне полоски, при дальнейшем движении фронта жидкости связываются в контрольной зоне тест-полоски с антивидовыми АГ. Появление окрашенной полосы в контрольной зоне подтверждает правильность проведения тестирования и диагностическую активность компонентов системы. Отрицательный результат тестирования — появление двух окрашенных полос (в тест-зоне и контрольной зоне) — указывает на отсутствие АГ в исследуемом образце или более низкую его концентрацию по сравнению с пороговым уровнем. Положительный результат тестирования — появление одной окрашенной полосы в контрольной зоне — свидетельствует о превышении АГ пороговой концентрации (рис. 6.1).

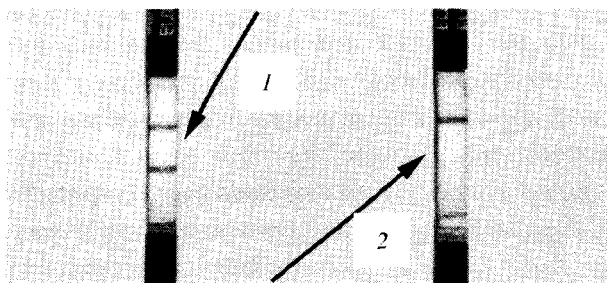


Рис. 6.1. Результаты иммунохроматографического анализа: 1 — отрицательный, 2 — положительный

Исследования таких тест-систем показали их высокую стабильность, воспроизводимость результатов и корреляцию с альтернативными методами. Денситометрическая характеристика степени неоднородности детектируемых полос дает величины в диапазоне 5–8%, что позволяет осуществлять вполне достоверную визуальную диагностику результатов анализа.

Эти тесты крайне просты и удобны в применении. Однако технологии изготовления компонентов таких тест-систем (в отличие от дот-блот тестов) достаточно сложны и являются собственностью фирм производителей, что ограничивает применение этих методов в обычной лабораторной практике.

6.1.3. Методики проведения дот- и блот-анализов с применением конъюгатов коллоидного золота

Иммунодот является одним из наиболее простых методов анализа АГ, иммобилизованных на мембранах, а в некоторых случаях позволяет оценить их количественное содержание. Чаще всего с помощью иммунодота исследуют растворимые АГ [491, 504]. Однако имеются немногочисленные работы, в которых в качестве исследуемого материала в технике дот-анализа с ферментной меткой или методе "colony blot" использовали корпускулярные АГ (целые бактериальные клетки) [482, 483, 485, 486, 579–581]. Впервые методика дот-анализа целых бактериальных клеток с визуализацией продуктов реакции биоспецифическими маркерами — конъюгатами КЗ ("*cell-gold immunoblotting*") была использована в работах [582, 583].

Протокол дот-анализа целых бактериальных клеток (непрямое мечение):

на вырезанную полоску нитроцеллюлозы (Synproг, ЧССР, диаметр пор 1,5 мкм) наносили микропипеткой по 1 мкл клеточной суспензии ($A_{600} = 0,5$) в центр очерченного квадрата со стороной 5 мм;

выдерживали образец в сухо-жаровом шкафу 15 мин при 60°C; блокировали места неспецифической сорбции в течение 30 мин при комнатной температуре в буфере: 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1% БСА (или 0,1% ПЭГ 20М), 0,02% Tween-20, (pH 8,2); заключали полоску нитроцеллюлозы в конверт из пленки "Papa-film" и инкубировали с АГ против исследуемых клеток в концентрации 10 мкг/мл в течение 1 часа при комнатной температуре; трижды по 15 мин отмывали образец в блокирующем буфере; инкубировали в растворе маркера (протеин А-КЗ, антииммуноглобулины-КЗ), разведенного до оптической плотности $A_{520} = 0,5$ в течение 30 мин;

при необходимости проводили процедуру усиления солями серебра (см. ниже);

образец отмывали проточной водой и высушивали.

В случае прямого варианта анализа образец непосредственно после блокировки инкубировали с гомологичными АТ, меченными КЗ. При исследовании растворимых АГ использовали НЦ с диаметром пор 0,45 мкм. Низкомолекулярные АГ “пришивали” к мембране ковалентно с помощью бифункциональных реагентов (формальдегид, глутаровый альдегид) согласно методике, описанной в [584], или использовали ПВДФ-мембраны.

Принцип блот-анализа заключается в том, что анализируемую смесь белков фракционируют в пластинках геля (агароза, полиакриламид). Затем на пластинку накладывают мембрану и переносят (тем или иным способом) фракции из геля на фильтр. В результате получают реплику, которую проявляют с помощью специфических АТ.

В нашей работе мы использовали методику электропереноса [489] после SDS-электрофореза [585, 586]. Причем использование для детекции конъюгатов КЗ позволяет проявлять блот после переноса с предварительно окрашенного геля [587]. Процедура иммунодетекции соответствовала таковой для дот-анализа, за исключением некоторых особенностей:

использовали нитроцеллюлозу фирм “Millipore” или “Bio-Rad” (США) с диаметром пор 0,45 мкм;

блокировку осуществляли в буфере, содержащем 2% сухого обезжиренного молока;

инкубацию в растворе АТ и маркера проводили в кювете при постоянном покачивании.

Для неспецифической окраски дотов и блотов *ex tempore* готовили раствор следующего состава [588]: 75 мл КЗ (средний диаметр частиц 30 нм, $A_{520} = 1,0$); 5 мл 2% водного раствора Tween-20; 20 мл 50 мМ цитратного буфера, pH 3,0.

Положительную реакцию в дот- (блот-) анализе наблюдали в виде красных пятен (полос) в местах специфического взаимодействия АГ с маркером через 3–5 мин, интенсивность окраски которых постепенно усиливалась в течение 1 ч. По истечении указанного времени мембраны промывали водой, подсушивали и хранили длительное время без изменения интенсивности окрашивания.

Необходимо отметить, что существует зависимость чувствительности метки от размера частиц золота [368]. Большинство фирм-производителей золотых маркеров рекомендуют для использования в блот-анализе конъюгаты зонда с частицами КЗ диаметром 20–30 нм.

Во всех вариантах применения маркеров — конъюгатов КЗ в твердофазных методах иммуноанализа помимо общих, принятых в иммунохимии контрольных реакций, для подтверждения специфичности мечения рекомендуется использовать препараты БСА и/или ПЭГ, меченных КЗ, а также контроли с немечеными реагентами [589].

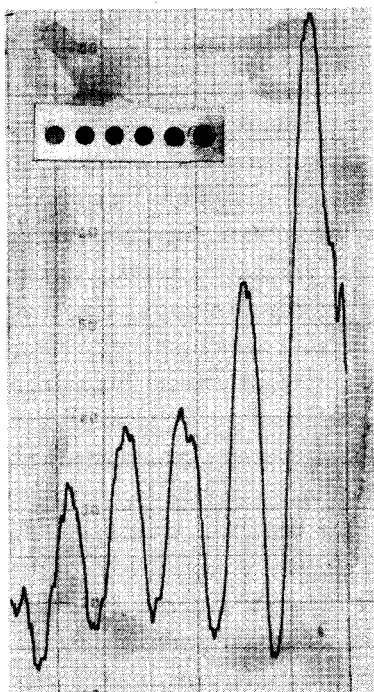


Рис. 6.2. Денситограмма дот-анализа растворимого АГ (IgG), выявленного маркером протеин А-КЗ

Иммуноблот-метод применяют, в основном, для качественной оценки результатов иммунохимической реакции. Иммунодот позволяет проводить полуколичественный анализ с последовательным разведением исследуемого АГ [473]. Разрабатываются подходы для количественной оценки результатов дот-блот анализа. Основным принципом подобных подходов являются обесцвечивание или растворение мембраны. Для этой цели используют ксилол [590], диоксан и циклогексан [591], иммерсионное масло [наши данные]. Далее применяют денситометрию с использованием фотометров или рефлектометров [528, 592, 593]. Пример денситограммы приведен на рис. 6.2.

6.1.4. Повышение чувствительности выявления результатов биоспецифических реакций в присутствии солей серебра

Методика усиления серебром основана на реакции, используемой в фотографии и получившей название физического проявления [594, 595]. Помимо восстановителя (действующее начало традиционного “химического” проявителя), “физический” проявитель содержит ионы или комплексы металлов. Из таких растворов происходит осаждение металлов на центры скрытого изображения. При гистохимическом серебрении в качестве подобных центров выступают частицы золота. КЗ катализирует восстановление ионов серебра (из соли) до металлического серебра. Оболочка металлического серебра вокруг частиц золота, в свою очередь, ускоряет восстановление, и реакция становится автокаталитической [596].

Впервые эта методика была предложена для гистохимического анализа в 1981 г. [597]. В качестве восстановителя автор использовал гидрохинон, а из солей серебра предпочтение отдал лактату. Имеется прямая зависимость между длительностью проявления и размерами отложений серебра [598]. Причем, для того чтобы быть контролируемым, процесс должен протекать достаточно медленно. По этой причине оптимальным считается применение лактата серебра, отличающегося низкой степенью диссоциации по сравнению с другими солями серебра (например, нитратом) [599]. Для замедления восстановления серебра было предложено также использовать защитный коллоид — гуммиарабик [597]. Причем последний применяют как с лактатом [170], так и с нитратом серебра [600]. Кроме того, существуют другие методики, основанные на использовании более доступного препарата — нитрата серебра [494, 601]. Гораздо реже в качестве источников ионов используют ацетат [602], бромид [603], сульфид [604] серебра. Однако наиболее простым и универсальным (применяемым как в микроскопических [605], так и в твердофазных методах анализа [508, 509]) нам представляется способ, предложенный основоположниками метода [90, 91].

Ниже приведен протокол проведения процедуры усиления серебром результатов биоспецифической реакции: после окрашивания КЗ-маркером образец (НЦ фильтр, электронно-микроскопическую сеточку) инкубировали в 2 М цитратном буфере (рН 4,0) в течение 2-х минут; *ex tempore* готовили проявляющий раствор: 11 мг лактата серебра и 85 мг гидрохинона в 10 мл 0,2 М цитратного буфера рН 4,0; инкубировали образец при комнатной температуре в проявляющем растворе 5 минут (инкубацию проводили в защищенной от света кювете); переносили образец в фиксирующий раствор (20% водный раствор тиосульфата натрия) на 2 минуты; промывали образец проточной водой.

Следует подчеркнуть, что готовый физический проявитель является фотоактивным и обладает ограниченным временем хранения. Увеличение времени проявления выше рекомендованного ведет к непропорциональному усилению за счет повышения фоновой окраски. В случае необходимости операция усиления может быть повторена. Кроме того, серебрёные блоты могут быть подвергнуты различным операциям усиления и ослабления, известным в фотографии [594, 595, 598], вплоть до полного отбеливания без опасности потерять скрытое изображение, например при фермеровском ослаблении.

6.2. Использование методов дот-анализа для серотипирования микроорганизмов

С середины прошлого века методы серологического анализа (хорошо развитые, например, для энтеробактерий) стали применять для изучения почвенных микроорганизмов [606]. Для специфической детекции бактерий, их белковых или полисахаридных структур использовали как поликлональные, так и моноклональные АТ, меченные флуоресцентными, ферментными или золотыми метками [607–609]. Серологические методы использовали для идентификации, количественного определения и визу-

ализации бактерий *in situ* В том числе при изучении процессов колонизации почвенными диязотрофами корней растений.

Для надежного использования в серологических исследованиях АТ обязаны удовлетворять определенным критериям. В частности, они не должны давать перекрестных реакций с бактериями других видов (в идеале — штаммов) и должны иметь высокую аффинность к исследуемому АГ. На наш взгляд, наиболее полно этим критериям соответствуют АТ, получаемые методом, разработанным Б.И. Щварцбурдом и Л.Ю. Матора в Лаборатории физической химии клеточных структур (ЛФХКС) ИБФРМ РАН [582, 583, 610]. Наиболее последовательно эффективность данного метода продемонстрирована на примере грамотрицательных бактерий рода *Azospirillum*, ставших модельным объектом в исследованиях явления микробно-растительной ассоциативности, активно развиваемых в России и за рубежом в последние два десятилетия [611].

Его суть заключается в том, что антисыворотки к исследуемым штаммам получают иммунизацией кроликов целыми бактериальными клетками, предварительно обработанными глутаровым альдегидом. Специальные исследования, результаты которых представлены, в частности, в работах [612–614], показали, что активация клеточной поверхности грамотрицательных бактерий глутаровым альдегидом приводит к получению АТ, специфичных к бактериальным О-антигенам.

Мы использовали эти моноспецифические АТ для серотипирования азоспирилл. На рис. 6.3 приведены результаты дот-анализа целых клеток для двух видов азоспирилл с использованием гомологичных АТ, специфичных к О-полисахаридам клеточной поверхности каждого из исследуемых штаммов. Для выявления связавшихся с клетками АТ применяли их непрямое мечение конъюгатом протеин А-КЗ. Использование непрямого мечения позволяет обойтись без стадий получения конъюгатов КЗ с АТ к каждому из исследуемых штаммов бактерий и весьма целесообразно при проведении серии экспериментов с большим числом штаммов.

Результаты, представленные на рис. 6.3, показывают, что АТ, полученные к целым клеткам азоспирилл по отмеченной выше

методике, обладают выраженной видовой и штаммовой специфичностью. При этом четкие перекрестные реакции, сравнимые с прямыми реакциями по интенсивности окрашивания мест связывания АТ с бактериальными поверхностными АГ, имеют место для штаммов *Azospirillum brasilense* Sp 107 и Sp 245. Данные штаммы были выделены из корней пшеницы и отличаются тем, что один был получен в полевых (Sp 245), а другой — в лабораторных (Sp 107) условиях [615]. Не исключено, что дополнительные исследования могут привести к заключению об идентичности данных штаммов по целому ряду фенотипических признаков.

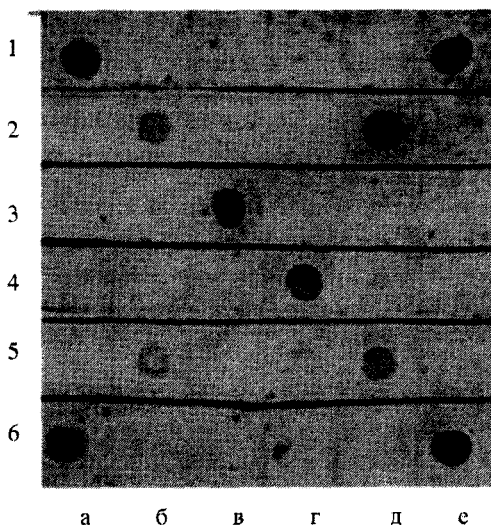


Рис. 6.3. Дот-анализ целых клеток *A. brasilense* Sp245 (а, 1), Sp7 (б, 2), JM125A2 (в, 3), Cd (д, 5), Sp107 (е, 6) и *A. lipoferum* Sp59b (г, 4) с гомологичными АТ

Четкая перекрестная реакция, сравнимая с прямой реакцией по интенсивности окрашивания, наблюдается также для штаммов *A. brasilense* Cd и Sp 7, что хорошо согласуется с литературными данными, полученными для этих близкородственных штаммов [616]. В то же время для АТ, полученных по традиционной методике (иммунизацией целыми клетками без обработки

глутаровым альдегидом), отмечается множество перекрестных реакций между разными штаммами, что определяется, вероятно, их белковыми АГ.

Следует отметить практически полную воспроизводимость результатов дот-определений, приведенных на рис. 6.3, при использовании клеток, подвергнутых предварительной термообработке при 100°C в течение 60 мин. Термостабильность антигенных детерминант, выявляемых в подобных сравнительных опытах, может служить дополнительным подтверждением сделанного ранее вывода о преимущественном иммунном ответе на углеводные АГ клеточной поверхности бактерий, обеспечиваемом при использованном нами способе иммунизации животных.

Полученные нами результаты принципиально согласуются с данными, полученными методами иммунофлуоресценции и агглютинации [617]. Заметим, что традиционная процедура иммунизации животных интактными клетками, использованная в работе [617], приводит к получению АГ, специфичных, по-видимому, как к углеводным, так и к белковым АГ азоспирилл. Для последних характерно большее число перекрестных реакций между разными штаммами, элиминируемых в результате термообработки клеток.

Таким образом, применение АГ, полученных описанным выше способом, в методе cell-gold immunoblotting делает возможным надежную идентификацию штаммов азоспирилл, например, при проведении таксономических и экологических исследований [618, 619].

6.3. Применение коллоидного золота в диагностике инфекционных заболеваний

Ранняя диагностика острых кишечных инфекций является весьма актуальной задачей современного здравоохранения. При достижении достаточной быстроты ответа (2–4 ч.), экспресс-методы приобретают важное ориентирующее значение для своевременного проведения комплекса противоэпидемических мероприятий (изоляция, дезинфекция, обследование контактных) и

назначения адекватной этиотропной терапии. Однако относящиеся к данной категории методы, например, иммунолюминесцентного анализа и ИФА (а также иммуноадсорбционные методы) не нашли достаточно широкого применения в клинической практике.

До сих пор основными методами лабораторной диагностики в большинстве клинических учреждений остаются бактериологический и серологический анализ (в том числе, реакция агглютинации (РА) и реакция непрямой гемагглютинации) [620]. Наряду с несомненной ценностью и важностью этих методов, они обладают рядом недостатков, из которых наиболее существенным следует признать позднее получение результатов исследования. Между тем, в клиническом и эпидемиологическом отношении, безусловно, важна ранняя диагностика заболевания.

Заметим, что большинство из используемых экспресс-методов разработаны для поиска АТ к возбудителям в крови или других биологических жидкостях больного, и лишь некоторые из них рассчитаны на непосредственную идентификацию возбудителя [485, 552]. Очевидно, что последние более предпочтительны с эпидемиологической точки зрения.

Целью исследований, отраженных в данном разделе монографии, была адаптация и оценка информативности метода дот-анализа с использованием конъюгатов КЗ с биоспецифическими зондами (непрямое мечение) и стандартных агглютинирующих сывороток для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций.

Исследуемый материал от больных (1 г кала в 10 мл стерильного забуференного физиологического раствора, рН 7,8) использовали одновременно для дот-анализа и традиционного бактериологического исследования [620]. Последний включал посев на среды обогащения (селенитовый бульон) и плотные селективные среды (Плоскирева, Эндо) с последующей идентификацией выделенных культур с помощью бактериоскопии, высевок на "пестрый ряд" и РА с видовыми сыворотками.

Как для РА, так и для дот-анализа применяли стандартные сухие кроличьи сыворотки: агглютинирующую сальмонеллезную поливалентную О-сыворотку групп А, В, С, D, Е (Тбили-

си), поливалентную агглютинирующую эшерихиозную сыворотку ОКА (Москва), агглютинирующую поливалентную сыворотку к шигеллам Флекснера, Ньюкасл, Зонне (Днепропетровск).

Для оценки чувствительности метода количество бактериальных клеток в растворе определяли с помощью метода спектротурбидиметрии [621], используя спектрофотометр Specord M40.

Дот-анализ проводили, как описано выше. В качестве биоспецифического зонда мы использовали козыи АТ против кроличьего γ -глобулина (Calbiochem, США), меченные КЗ.

Предварительные эксперименты с использованием чистых культур бактерий показали, что метод дот-анализа целых клеток с использованием специфических сывороток и антииммуноглобулинов, меченных КЗ, позволяет выявлять до 7×10^3 клеток в мл. В то время как чувствительность ИФА целых бактериальных клеток составляет 10^4 – 10^5 кл/мл [485].

Полученные данные послужили основанием для применения метода дот-анализа при исследовании материала от 28 больных, поступивших в стационар (Кочкуровская ЦРБ, Мордовия) с предварительным диагнозом “кишечная инфекция неясной этиологии”. Результаты исследований, проведенных методом дот-анализа, сопоставляли с результатами бактериологического (с последующей РА) анализа (табл. 6.2). В таблице приведено количество обследованных больных с диагнозами, установленными двумя методами.

Таким образом, метод дот-анализа с использованием иммунозолотых маркеров позволяет идентифицировать возбудителей кишечных инфекций, по нашему мнению, более надежно и оперативно, чем рутинные методы. Продолжительность анализа составляла около двух часов. В ряде случаев метод позволил выявить возбудителя при отрицательном результате бактериологического исследования [622, 623].

Приведенные данные позволяют заключить, что предлагаемый метод может быть с успехом использован в лабораторной диагностике кишечных инфекций, поскольку он обладает экспрессностью, высокой специфичностью и чувствительностью. В настоящее время нами проводится работа по дальнейшей оп-

тимизации метода с целью сокращения сроков проведения анализа при использовании большего количества сывороток с более узкой специфичностью, а также исследуется возможность автоматизации метода.

Говоря о перспективах развития метода дот-анализа, можно отметить, что чувствительность и оперативность определения бактериальных АГ может быть увеличена при использовании АТ, иммобилизованных на НЦ (сэндвич), и прямых меток АТ-КЗ, либо биотинилированных АТ и маркера авидин (стрептавидин)-КЗ в качестве выявляющего агента, а также при применении процедуры усиления солями серебра.

Таблица 6.2

Результаты диагностики кишечных инфекций методами дот- и бактериологического анализа

Метод	Диагноз				
	Коли-инфекция	Сальмонеллез	Шигеллез	Стафилококковая инфекция	Кишечная инфекция неясной этиологии
Дот-анализ	8	4	10	—	6
Бактериальный анализ	6	3	8	2	9

Предложенный метод мы использовали также при создании тест-системы для идентификации *Yersinia pseudotuberculosis* у больных псевдотуберкулезом животных и человека [624] и при исследовании взаимодействия клеток *Listeria monocytogenes* с набором моноклональных АТ [625].

Для ранней диагностики синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) был разработан метод твердофазного иммуноанализа для быстрого и чувствительного обнаружения АТ к АГ вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [626]. Метод основан на выявлении АТ, связавшихся с искусственными АГ ВИЧ (иммобилизованными на НЦ мембране), с помощью конъюгатов КЗ с анти-IgG или протеином А. Использована модельная тест-система с кроличьими АТ против ВИЧ и синтетическими или рекомбинантными АГ [627]. Применение конъюгатов КЗ позволило существенно упростить методику по сравнению с ИФА и сократить время эксперимента. Предполагается, что развиваемый метод может быть особенно целесообразным для массового скрининга ВИЧ-инфекции.

В заключение этой главы можно констатировать, что развитый нами метод дот-блот анализа с использованием биоспецифических маркеров — конъюгатов КЗ может быть, по нашему мнению, с успехом использован как для фундаментальных (например, в анализе строения клеточной поверхности почвенных бактерий), так и для прикладных исследований. К примеру, в практике лабораторной диагностики инфекционных заболеваний человека и животных, для изучения и полевого анализа хозяйственно значимых АГ в селекционной работе, фитопатологических исследованиях, симбиологии и т.д. [628].

7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

7.1. Оптимизация метода SPIA для количественного иммуноанализа

Метод дот-блот анализа с применением биоспецифических маркеров — конъюгатов КЗ, представленный в главе 6, находит все более широкое распространение и признание благодаря его высокой чувствительности и простоте выполнения. Однако этот метод имеет ряд ограничений, среди которых, в первую очередь, необходимо отметить трудности строгой количественной интерпретации результатов, сложность работы с низкомолекулярными лигандами и значительные затруднения, возникающие при выявлении компонентов сложных биологических систем (гомогенаты, экссудаты и т.п.).

В 1980 г. Дж. Лойверинг и др. предложили новый метод иммуноанализа, названный авторами *иммуноанализ на частицах золя* (sol particle immunoassay, *SPIA*) [629]. В этом методе используются два важных свойства золотых золей: их типичный яркий красный цвет, который практически не изменяется при адсорбции на частицах золота высокомолекулярных соединений, и значительное изменение поглощения в видимой области спектра и, следовательно, цвета золя, сопровождающее агрегацию частиц. Это изменение спектра поглощения четко детектируется спектрофотометрически или визуально.

Метод SPIA в авторской интерпретации довольно прост в исполнении. Аликвоты забуференной взвеси золотосодержащего маркера и раствора исследуемого образца смешивают в реакционном сосуде. В течение инкубационного периода (0,5–2 часа) контролируют положение и величину максимума спектра по-

глощения суспензии, либо визуально оценивают ее цвет. Если в результате биоспецифической реакции, реализуемой на поверхности коллоидных частиц, произошла дестабилизация золя, частицы золота агрегируют (при использовании поликлональных АТ этот процесс называется агглютинацией), что приводит к существенным изменениям в спектре поглощения суспензии с заметным изменением ее цвета (с красного на голубой или серый). Для количественной регистрации результатов реакции возможно применение широко распространенных спектрофотометров и колориметров.

Авторы использовали разработанный и оптимизированный метод (с использованием частиц золота более крупных размеров и моноклональных АТ к различным участкам АГ) для выявления в моче беременных женщин хориогонического гонадотропина [630–634]. На основе их разработок фирмой Chefaro (Нидерланды) был выпущен набор DiscretetestTM для внебольничной ранней диагностики беременности. Наборы для иммуноколориметрического определения ревматоидного фактора и стрептолизина выпускаются фирмой “ПЛИВА-Лахема” (Чехия).

В дальнейшем этот метод применяли для иммуноанализа АГ шистозом [635], рубелл [636], для определения констант аффинности различных изотипов мышиных моноклональных IgG [422, 637], для количественного определения иммуноглобулинов [638, 639], для детекции цистатина С — эндогенного маркера фильтрационной способности почечных гломерул [640].

В 2002 г. вышла работа [641], в которой авторы, заново “открыв” данный метод, использовали его для количественного определения АТ к протеину А с помощью конъюгата протеина А с КЗ. Для повышения чувствительности аналитической реакции используют новые способы регистрации взаимодействия (в частности, АГ и АТ, меченных КЗ) такие как фото-термальная спектроскопия [642], лазерная двулучевая абсорбционная спектроскопия [643], гипер-рэлеевское рассеяние [644]. В работе [645] был предложен метод совместного использования агглютинации латексных и золотых частиц (гетерогенный SPIA).

Все варианты использования метода SPIA оказались весьма простыми в исполнении и при этом продемонстрировали высо-

кую чувствительность и специфичность. Однако исследователи столкнулись с тем фактом, что не всегда реакция типа АГ–АТ на частицах золя приводит к дестабилизации системы (агрегации). В ряде случаев, несмотря на заведомую комплементарность пары, изменения цвета раствора и, соответственно, спектров поглощения не происходило или они были незначительными.

После серии предварительных экспериментов в работе [425] было выдвинуто предположение, что в этом случае, вероятно, происходит образование второго белкового слоя на золотых частицах без потери агрегативной устойчивости золя (рис. 7.1). Изменения спектров, обусловленные адсорбцией биополимеров на поверхности металлических частиц, сравнительно малы. Однако даже такие незначительные изменения спектров поглощения, обусловленные изменением структуры биополимерного слоя (и, в частности, его среднего показателя преломления) около поверхности золотых наночастиц, оказалось возможным регистрировать и использовать для количественного анализа в биологических приложениях, что продемонстрировали авторы работ [417, 433, 434, 445].

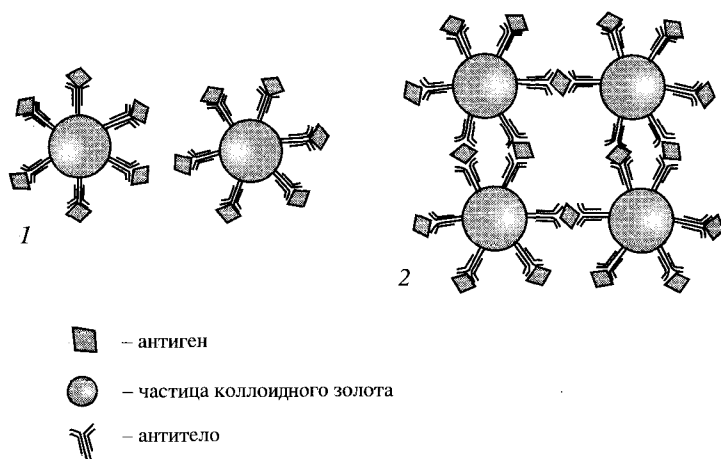


Рис. 7.1. Схема двух вариантов реализации биоспецифических взаимодействий на частицах золя: 1 — образование второго белкового слоя на частицах золота; 2 — агглютинация

Новый вариант использования описываемого метода был предложен Ч. Миркиным и др. [4]. Он основан на колориметрическом определении полинуклеотидов при их взаимодействии с частицами КЗ, конъюгированными посредством меркаптоалкилов с определенными олигонуклеотидами. Внесение в реакционную смесь комплиментарных полинуклеотидов приводит к формированию упорядоченной трехмерной структуры золотых наночастиц вследствие гибридизации с олигонуклеотидами. Этот процесс сопровождается изменением спектра поглощения раствора и детектируется визуально или фотометрически [442, 646].

Возможность создания упорядоченных трехмерных структур с использованием IgG-функционализированных золотых наночастиц при их взаимодействии с АГ продемонстрировали авторы работ [398, 647], а с использованием аптамеров — авторы статьи [648]. В работах [649, 650] показана возможность получения биологически программируемых ансамблей золотых наночастиц с применением системы авидин-биотин. В работе [236] аналогичный подход был использован для детекции лектинов. В статье [651] описано получение самосборных структур за счет Ca^{++} -зависимой агрегации углеводов-покрытых золотых наночастиц.

Несмотря на то, что метод SPIA весьма прост в реализации, за более чем 20-летнюю историю его развития количество публикаций и примеров его реального практического использования оказалось довольно скромным. Только в самое последнее время появились работы, указывающие на возможность использования данного метода в качестве высокопроизводительного клинического теста. Причина его не очень активного внедрения связана, на наш взгляд, с недостаточным пониманием физико-химических и оптических механизмов, ответственных за трансформацию сигналов, возникающих при биоспецифическом связывании молекул-мишеней с КЗ-конъюгатами, в показатели ослабления или рассеяния света суспензиями.

В связи с этим, целью описанных ниже экспериментов была разработка модифицированного варианта биоспецифического агрегационного анализа с использованием серийного спектрофотометра, а также микротитровальных планшетов и ИФА-ридера.

В качестве биоспецифической пары для конъюгата КЗ с протеином А был выбран человеческий IgG (Sigma, США). Спектрофотометрическую регистрацию взаимодействия биоспецифической пары проводили с использованием спектрофотометра Specord M40. Смешение всех компонентов проводили непосредственно в 1-см фотометрических кюветах. Спектры поглощения записывались в циклическом режиме с регулируемым временным интервалом между каждой регистрацией. Минимальное время между смешением компонентов и регистрацией первого спектра составляло около 30 сек. Кроме того, регистрацию проводили в микротитровальных планшетах с использованием ИФА-анализатора АИФ-Ц-01С (ЗАО "ИЛИП", Россия).

На рис. 7.2 приведены изменяющиеся во времени спектры поглощения агрегатов, образующихся в результате биоспецифического взаимодействия конъюгата протеина А с КЗ и IgG. Протеин А — белок клеточной стенки стафилококка, способный с высокой константой связывания взаимодействовать с Fc-фрагментом молекулы Ig. Причем каждая молекула протеина А способна связывать, по меньшей мере, две молекулы Ig [652, 653]. Обращает на себя внимание тот факт, что характер спектральных кривых агрегации отличается от такового для солевой агрегации, описанной в работе [440]. В частности, отсутствует второй пик в длинноволновой области, характерный для быстрой солевой агрегации, а наблюдается лишь смещение максимума поглощения в красную область и снижение его абсолютного значения. Причем изменения спектров гораздо более выражены в случае, когда на золотых частицах сорбированы оба участника биоспецифической реакции (рис. 7.3). Эти изменения спектров очень похожи на таковые, описанные в работе [646] при колориметрическом определении олигонуклеотидов. Визуально реакция проявлялась в изменении цвета раствора с красного на голубой или серый. В качестве контроля были использованы смеси золей с раствором БСА. При этом изменений оптических характеристик взвесей не зарегистрировано.

В другой серии опытов смешивали стандартные суспензии маркера протеин А — КЗ с растворами IgG различных концентраций. Результаты реакции регистрировали спектрофото-

метрически через каждые 5 мин в течение часа. На основе полученного таким образом ряда спектральных кривых построен график зависимости положения максимума кривой ослабления света от концентрации вносимого вещества через 30 мин после смешения компонентов (рис. 7.4). Таким образом, сопутствующие биоспецифической агрегации изменения оптических характеристик зависят от концентрации вносимого в суспензию вещества, что может послужить основой для его количественного определения (в том числе в составе различных смешанных систем). Подобный тест может найти применение в медицине, ветеринарии и лабораторной практике.

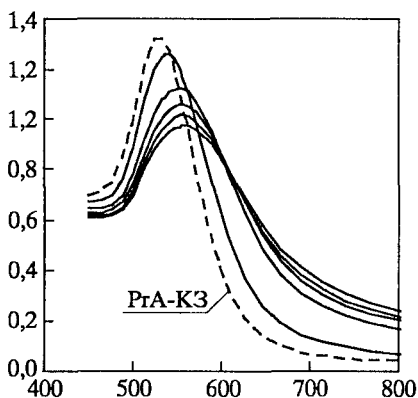


Рис. 7.2. Динамика спектров поглощения агрегатов, образованных в результате биоспецифического взаимодействия конъюгата белок А-КЗ и IgG

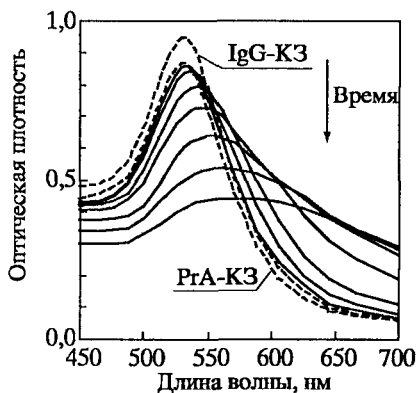


Рис. 7.3. Динамика спектров поглощения агрегатов, образованных в результате биоспецифического взаимодействия белка А и IgG, меченных КЗ

Однако такой способ регистрации биоспецифических взаимодействий обладает рядом недостатков, в том числе низкой оперативностью, большим расходом маркера и определяемого вещества. Для преодоления этих недостатков стандартной реализации SPIA на серийном спектрофотометре мы предложили использовать микротитровальные планшеты и ИФА-ридер. Применение модифицированного варианта SPIA проиллюстрируем на примере количественного определения IgG в реакции с протеином А, меченым КЗ. В лунках планшета создавали после-

довательные двойные разведения IgG с начальной концентрацией 1 мг/мл. Затем в каждую лунку добавляли одинаковое количество (50 мкл) маркера протеин А-КЗ с оптической плотностью $A_{520} = 1,0$. Через 30 мин измеряли оптическую плотность с использованием ИФА-ридера при $\lambda = 620$ нм. Кривая зависимости оптической плотности раствора от количества внесенного белка представлена на рис. 7.5. Следует отметить, что минимальное выявляемое количество белка при этом способе регистрации составило 0,2 мкг (по сравнению с 2 мкг при регистрации традиционным способом). Кроме того, значительно сократился расход белка и маркера, а также время проведения анализа. Аналогичные результаты были получены при исследовании взаимодействия агглютинина зародышей пшеницы и конъюгата фетуина с КЗ.

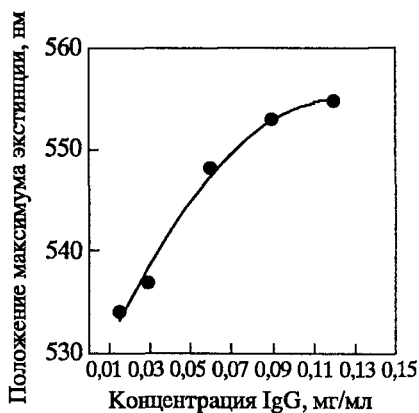


Рис. 7.4. Калибровочная кривая для количественного определения IgG при биоспецифическом взаимодействии с маркером протеин А-КЗ

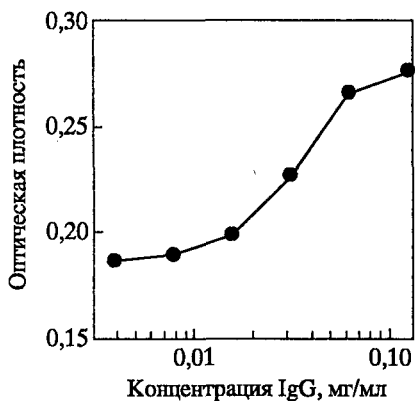


Рис. 7.5. Зависимость оптической плотности раствора протеин А-КЗ при $\lambda = 620$ нм от количества внесенного IgG

Исследованные нами агрегаты биоконъюгатов не имели строго детерминированного межчастичного расстояния, но для понимания оптических свойств этих объектов решающим обстоятельством является то, что золотые частицы кластера не находятся в непосредственном контакте, а разделены тонкой диэлектрической прослойкой биополимеров, что подтверждено прямы-

ми электронно-микроскопическими исследованиями, представленными в работе [425].

Исследованные нами агрегаты биоконъюгатов не имели строго детерминированного межчастичного расстояния, но для понимания оптических свойств этих объектов решающим обстоятельством является то, что золотые частицы кластера не находятся в непосредственном контакте, а разделены тонкой диэлектрической прослойкой биополимеров, что подтверждено прямыми электронно-микроскопическими исследованиями, представленными в работе [425].

7.2. Метод определения концентрации белков с применением конъюгата трипсин-коллоидное золото

Существуют различные методы количественного определения белков в растворе. Наиболее распространены спектрофотометрические (метод Варбурга-Христиана), флуорометрические и колориметрические (биуретовая реакция, методы Лоури, Бредфорд и др.) [466, 654, 655]. Как было отмечено выше, КЗ в цветных реакциях на белки, содержащиеся в спинномозговой жидкости и сыворотке крови, использовалось с первой половины 20-го века [40, 41]. Предложенные в этих работах методы основаны на свойстве белков выступать (в зависимости от их физико-химических свойств) либо флоккулянтами, либо стабилизаторами золотых коллоидов. Склонность КЗ изменять агрегационные и оптические свойства при взаимодействии с белками отмечалась в работах [656, 657]. Изменения спектров поглощения при взаимодействии “голых” золотых наночастиц с низкомолекулярными веществами использовали для количественного определения пептидов, аминокислот, пестицидов, тяжелых металлов и др. [658–662].

Способность золотых частиц при их взаимодействии с белками агрегировать с изменением цвета раствора послужила основой для разработки метода колориметрического количественного определения белков [412, 416]. Этот метод основан на использовании “золотого красителя” (AuroDye), впервые приме-

ненного для неспецифической окраски белков в блот-анализе. Напомним, что золотой краситель представляет собой золь золота, частично стабилизированный полимерами типа Tween-20, ПЭГ-20М и т.п., который в кислой среде обладает способностью неспецифически взаимодействовать с биомакромолекулами. Это происходит за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий частиц золота с макромолекулами, а также за счет ионных взаимодействий стабилизирующих полимеров с тиоловыми и свободными аминогруппами основных белков. В настоящее время ряд фирм, в частности "Diversified Biotech" (США), "BioCell" (Великобритания), "Aurion" (Нидерланды), "Nanoprobes" (США), выпускает наборы для количественного определения белков с помощью AuoroDye.

Подробно преимущества и недостатки этого метода рассмотрены в диссертационной работе [663] и статье [308]. На рис. 7.6 приведен типичный пример оптических изменений, сопровождающих взаимодействия AuoroDye с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА).

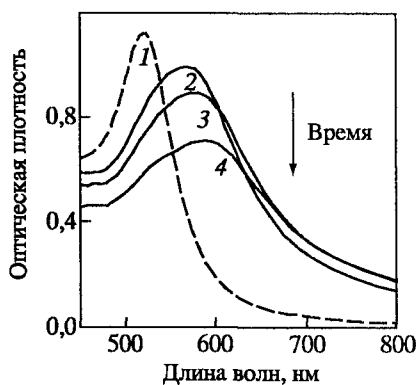


Рис. 7.6. Динамика спектров поглощения света золями КЗ-15, защищенными Tween-20 (рН 3), после добавления к ним раствора ЧСА: 1 — исходный золь, 2 — через 6 мин, 3 — через 20 мин, 4 — через 60 мин

Общим для всех белков (в отличие от других биополимеров) является регулярное чередование пептидных связей, в то время как специфические свойства белковых молекул определяются, главным образом, деталями строения боковых радикалов их аминокислотных остатков. Подлинно количественным определением белков могло бы стать определение общего количества пептидных связей в системе. Однако единственный из известных методов, основанный на специфической реакции пептидной связи с ионами

меди в щелочной среде — биуретовый, не отличается высокой чувствительностью и селективностью [466].

В данном разделе книги описан разработанный нами метод количественного определения белка в растворе с применением конъюгата КЗ с трипсином. Трипсин — панкреатическая сериновая протеиназа, которая секретируется в кишечник и расщепляет белки пищи. Трипсин катализирует гидролиз пептидных связей белков, содержащих основные аминокислоты, такие, как лизин или аргинин. Т. е., используя в качестве выявляющего агента трипсин, мы гарантированно получаем возможность обнаружить в растворе только белковые молекулы.

Известно, что в гисто- и цитохимии, помимо иммунологических реагентов, для ультраструктурных исследований используют меченые золотом ферменты: целлюлазу [664], РНКазу, ДНКазу [665], β -глюкозидазу [666], полигалактуроназу [667] и др. Показано, что ферменты, иммобилизованные на золотых частицах, сохраняют свою биокаталитическую активность [668, 669] и способны взаимодействовать с белками, присоединяясь к субстрату без последующей его деградации [670].

Поскольку, как правило, к одной молекуле белка присоединяется несколько молекул фермента, создаются условия для агрегации в системе белок + конъюгат фермента с КЗ, которую можно зафиксировать фотометрически [671]. На этом основан предлагаемый нами новый метод аналитического неспецифического определения белков с использованием конъюгата трипсин — КЗ, заключающийся в регистрации взаимодействия пептолитического фермента, адсорбированного на золотых наночастицах, с белком в растворе.

Конъюгат трипсина (Serva, Германия) с КЗ готовили по обычной схеме. Золотое число для трипсина составило 10 мкг/мл при рН золотого золя 9,5. Приготовленный конъюгат тестировали методом дот-анализа. В качестве молекул-мишеней в наших экспериментах использован тот же белок — IgG человека — что и в методе SPIA. Измерения проводили с применением как спектрофотометра Specord M40, так и ИФА-ридера. Установлено, что при взаимодействии IgG с трипсином, конъюгированным с золотыми наночастицами, происходят количественно детерми-

нированные агрегационные процессы. Кинетические спектры агрегации очень похожи на таковые для пары протеин А-IgG. Калибровочная кривая, построенная по результатам регистрации оптической плотности при $\lambda = 620$ нм на ИФА-ридере, представлена на рис. 7.7. Минимальное выявляемое количество IgG при использовании конъюгата трипсин-КЗ составило 0,2 мкг.

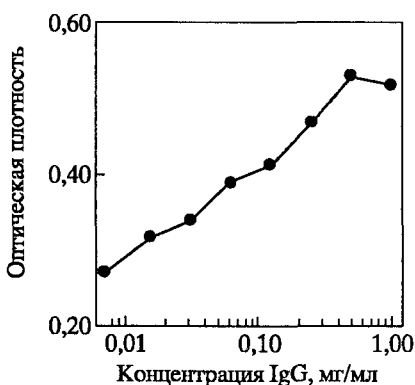


Рис. 7.7. Зависимость оптической плотности раствора трипсин-КЗ при $\lambda = 620$ нм от количества внесенного IgG

Таким образом, предложенный вариант метода SPIA с использованием микротитровальных планшетов и ИФА-ридера позволяет существенно сократить время анализа при большем количестве исследуемых проб и большей чувствительности метода. Новый метод анализа с использованием конъюгатов протеолитических ферментов с КЗ кажется нам весьма перспективным для быстрого и чувствительного количественного определения белков [672].

7.3. Развитие методов колебательной спектроскопии на основе конъюгатов золотых наночастиц с биологическими макромолекулами

Спектры поглощения света в видимой и УФ-областях, о которых шла речь выше, возникают в результате электронных переходов в атомах и молекулах между основными энергетическими уровнями. Поглощение же в ИК-области обусловлено переходами между колебательными подуровнями, отвечающими разной колебательной энергии функциональных групп. В ИК-спектроскопии чаще всего используют среднюю часть ИК-области — $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. Для интерпретации ИК-спектров составлены специальные каталоги и таблицы, в которых указаны

характеристические частоты колебаний различных групп (см., например, табл. 7.1).

Таблица 7.1

Характеристические частоты колебаний некоторых групп*

Группа (тип колебаний)	Волновое число, см^{-1}
O–H (валентные)	3350–3250
N–H (валентные)	3460–3280
C–H (валентные)	2980–2850
$\text{C}\equiv\text{C}$ (валентные)	2300–2100
C=O (валентные)	1870–1650
C=N (валентные)	1620–1560
C=C (валентные)	1645–1615
N–H (деформационные)	1650–1590
C–H (деформационные)	1470–1360
O–H (деформационные)	1440–1260

* Следует отметить, что на энергию колебательных переходов функциональных групп зачастую достаточно сильно влияют вид и взаимное расположение групп атомов, непосредственно к ним примыкающих. В связи с этим, в отдельных случаях частоты колебаний функциональных групп могут выходить за указанные диапазоны.

Значения молярных коэффициентов экстинкции для ИК-области меньше, чем для видимой и УФ-областей. Поэтому с помощью ИК-спектроскопии можно исследовать или чистые вещества, или достаточно концентрированные растворы. Жидкости заливают между оптически прозрачными стеклами, где они образуют тонкую пленку, или в кювету. Твердые вещества измельчают и суспендируют в оптически прозрачной среде. Растворы исследовать сложнее, чем твердые вещества, поскольку растворитель часто поглощает в этой же области спектра. Чтобы повысить чувствительность и разрешающую способность метода ИК-спектроскопии, в современных модификациях используют Фурье-преобразование.

ИК-Фурье спектроскопия представляет собой один из вариантов метода ИК-спектроскопии и, по существу, не является самостоятельным спектральным инструментом. Спектры веществ, полученные на ИК-Фурье спектрометрах, не отличаются от спектров, полученных на диспергирующих ИК-спектрометрах (за исключением более высокого разрешения полос в ИК-Фурье спектрах), и также являются специфическими характеристиками данного вещества.

Термин "ИК-Фурье спектроскопия" возник с появлением нового поколения приборов, в основе оптической схемы которых используются различного типа интерферометры. После получения результирующей интерферограммы исследуемого вещества, его ИК-спектр рассчитывается компьютером с использованием математического преобразования Фурье. ИК-Фурье спектрометры отличаются от диспергирующих приборов, в которых набор ИК-частот получают с помощью диспергирующих устройств (призмы или дифракционной решетки), прежде всего, более простой и надежной конструкцией прибора, возможностью выполнять исследования, требующие проведения быстрого сканирования. Например, измерения спектров веществ в процессе газохроматографического разделения, проведение измерений в потоке или кинетических измерений [673].

Эффективное использование оборудования для ИК-Фурье спектроскопии предполагает соответствующую подготовку пробы, предназначенной для анализа. При работе на ИК-Фурье

спектрометрах можно использовать как традиционные способы пробоподготовки для ИК-спектроскопии, так и некоторые новые приемы, которые обусловлены, прежде всего, меньшим количеством вещества, достаточным для анализа, и возможностью использования дополнительных устройств. Способы пробоподготовки, которые реально могут быть использованы в практике, приведены ниже [674]:

Прессование таблеток с галогенидами щелочных металлов (не поглощающих в ИК-диапазоне).

Суспензионный метод, представляющий собой растирание образца до мелкодисперсного состояния (размер частиц 2-7 мкм) и приготовление суспензии в иммерсионной жидкости с близким к образцу показателем преломления.

Получение пленок. При таком способе пробоподготовки необходимо на окошке из оптически прозрачного материала сформировать тонкую (около 5 мкм) пленку диаметром 3-5 мм.

Метод ослабленного полного внутреннего отражения (и его вариант — метод диффузного отражения).

Исследование веществ в жидком и газообразном состоянии. Анализ проводится, соответственно, в жидкостных и газовых кюветах, имеющих два окошка из оптического материала, которые помещаются на пути луча спектрометра и между которыми находится исследуемое вещество.

Исследование образца с предварительным разделением компонентов методом тонкослойной хроматографии.

Применение твердофазной экстракции.

Анализ по продуктам пиролиза.

Еще одним типом *колебательной спектроскопии* является *спектроскопия комбинационного (рамановского) рассеяния*. Исследования, впервые проведенные Л.И. Мандельштамом, Н.Д. Папалекси и Г.С. Ландсбергом (а затем Ч. Раманом и К. Кришнаном), показали, что, кроме линии с частотой, соответствующей частоте падающего света, в спектре рассеянного излучения наблюдаются добавочные линии-спутники (стоксова и антистоксова компоненты). Таким образом, спектр рассеянного света является комбинацией частоты падающего излучения и частот, отстоящих от нее на величину, определяемую ча-

стотой внутримолекулярных колебаний (обычно соответствует ИК-диапазону). Отсюда происходит название — комбинационное рассеяние света (КРС) [372].

Первые эксперименты по наблюдению КРС в жидкостях и кристаллах были сопряжены с огромными экспериментальными трудностями. Это связано с чрезвычайно малой интенсивностью комбинационных “спутников”, возникающих при возбуждении КРС спонтанными источниками света. Обычно такими источниками в первых опытах служили дуговые ртутные лампы. В результате для получения спектров были необходимы многочасовые и даже многосуточные экспозиции.

Другая трудность состояла в том, что слабый сигнал КРС находился сравнительно недалеко по шкале частот от частоты интенсивного возбуждающего излучения. В связи с этим обычные монохроматоры оказались малоэффективными для анализа спектров КРС. Для преодоления этого ограничения были созданы специальные Раман-спектрометры, позволяющие устранить “паразитный” фон возбуждающего излучения. Применение в качестве источника света лазеров позволило снять многие затруднения, существовавшие на ранних этапах развития метода КРС [675].

Как ИК-, так и КРС-спектроскопия являются весьма эффективными взаимодополняющими инструментами исследования строения молекул, поскольку набор частот внутримолекулярных колебаний связан с их структурой, а также межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями [676]. Однако относительно малая интенсивность сигнала делает его регистрацию достаточно сложной задачей, требующей применения современных лазерных источников света и систем счета фотонов.

В 1974 г. М. Флейшман предложил увеличить эффективное число молекул, участвующих в рассеянии от адсорбированного монослоя, увеличив реальную площадь поверхности при сохранении “видимой” площади, освещаемой излучением накачки. Для этого он сделал шероховатой поверхность серебра методом анодного травления и снимал спектры адсорбированного на этой поверхности вещества. При этом регистрируемая интенсивность

КРС возросла в 10^6 – 10^7 раз, в то время как площадь разрыхленной травлением поверхности серебряного электрода увеличивалась только на порядок [677]. Как было выяснено позднее, за наблюдаемым усилением КРС стоял новый нелинейный эффект, который был назван *гигантским комбинационным рассеянием* (ГКР).

ГКР обладает рядом особенностей, отличающих его от обычного КРС. Во-первых, сечения КРС для колебательных мод адсорбированных молекул могут увеличиваться в 10^{10} и более раз по сравнению с аналогичными величинами для неадсорбированных молекул. Во-вторых, величина усиления зависит от частоты возбуждения и степени шероховатости подложки по специфичному для ГКР закону. В-третьих, спектры ГКР многих молекул сильно отличаются от соответствующих спектров КРС молекул в свободном состоянии. Это проявляется в избирательном усилении определенных колебаний, а также в появлении новых полос в спектре ГКР. Кроме того, при адсорбции молекул на поверхности металла происходит изменение люминесценции, поглощения, ряда нелинейных эффектов, а также возникает наведенная оптическая активность [156].

При рассмотрении вопроса, связанного с усилением КРС адсорбированных молекул, следует учитывать два очевидных обстоятельства. Во-первых, вблизи поверхности металла падающее и рассеянное излучения будут усилены по сравнению с ситуацией, когда вещество распределено в объеме. Это происходит за счет резонансного возбуждения поверхностных электромагнитных волн на шероховатой поверхности. Кроме того, в отдельных структурах на поверхности, а также в малых изолированных частицах будут существовать локальные резонансы, связанные с возбуждением под действием света коллективных электронных осцилляций. Это приведет к увеличению индуцированного дипольного момента молекулы, находящейся вблизи металла. Во-вторых, если в случае изолированной молекулы КРС является следствием модуляции ее электронной поляризуемости колебаниями молекулы, то при адсорбции необходимо рассматривать поляризуемость системы молекула — металл. Это означает появление новых возбужденных состояний, обусловленных

возможностью переноса заряда, а также локальными изменениями плотности электронного заряда вблизи поверхности, возникающими вследствие химической связи, либо туннелирования электронов металла к месту расположения молекулы. В связи с этим различают два типа механизмов усиления КРС при адсорбции: электромагнитные механизмы, связанные с увеличением локального электромагнитного поля вблизи поверхности, и молекулярные механизмы — за счет образования новых возбужденных состояний комплекса молекула — металл [678, 679].

В настоящее время накоплен обширный экспериментальный и теоретический материал по ГКР молекулами, расположенными вблизи поверхности металла. В то же время появляется все больше работ, целью которых является не столько изучение физических аспектов явления ГКР, сколько практические применения метода для решения прикладных задач физики поверхности, аналитической химии и биохимии, биофизики и т.д. Одним из наиболее многообещающих приложений ГКР является изучение структурно-функциональных особенностей различных классов биологических молекул — аминокислот, нуклеиновых оснований, водорастворимых, мембранных и светочувствительных белков, нуклеиновых кислот и надмолекулярных комплексов [680].

При применении спектроскопии ГКР к изучению сложных молекул особый интерес представляет вопрос о том, в какой мере наблюдаемое усиление сечения КРС обусловлено электромагнитными, а в какой — молекулярными механизмами. При этом достаточно знать характерное расстояние от поверхности металла, на котором проявляется эффект усиления. Очевидно, что в условиях реализации дальнодействующей компоненты механизма усиления КРС можно получать спектры, идентичные спектрам КРС неадсорбированных молекул, но при значительно более низком пороге регистрации. Тогда как при короткодействующем механизме существует возможность анализа топографии макромолекул, выяснения природы групп, имеющих возможность вступать в непосредственный контакт с поверхностью металла. Исключительно важным представляется также вопрос о сохранении конформации макромолекул при адсорб-

ции на поверхности металла. По-видимому, увеличение сечения КРС за счет электромагнитного механизма является наиболее щадящей методикой, поскольку в этом случае хемосорбция с образованием комплекса молекула — металл не является необходимым условием, как это имеет место для молекулярного механизма.

Оптимальной системой для получения спектров ГКР биомолекул при реализации дальнедействующего электромагнитного механизма усиления является металлическая поверхность с регулярными неоднородностями одинаковых размеров, обеспечивающими эффективное возбуждение в металле поверхностной электромагнитной волны. Молекулярный механизм усиления преобладает при адсорбции молекул на электрохимически разрыхленных электродах. Известен ряд примеров, когда в этой системе адсорбция не вызывала изменения конформационных и функциональных свойств биополимеров, однако в каждом конкретном случае этот вопрос требует специального рассмотрения. Таким образом, наиболее существенной проблемой применения эффекта ГКР к изучению биомолекул является выбор условий избирательной реализации электромагнитной или молекулярной компонент механизма усиления.

Из вышесказанного следует, что метод спектроскопии ГКР обладает рядом уникальных возможностей, которые делают его весьма перспективным для исследования широкого класса биологических молекул. Прежде всего, это связано с высокой чувствительностью метода. Спектры ГКР биополимеров удалось регистрировать при концентрациях на 3–4 порядка меньших, чем в традиционной спектроскопии КРС. Это преимущество носит принципиальный характер, поскольку многие биологически важные соединения доступны в ограниченных количествах и, кроме того, очень часто биополимеры не удается растворить при высоких концентрациях. Отметим также, что при концентрациях, существенно превышающих физиологические значения, может происходить агрегация биомолекул, приводящая к изменению их структуры.

В отличие от других методов оптической спектроскопии, метод спектроскопии ГКР дает возможность изучения состояния

отдельных групп, находящихся на поверхности биологических макромолекул и надмолекулярных комплексов. Это особенно важно, поскольку огромное число биохимических процессов в клетке протекает именно на границе раздела фаз. При определенных условиях заряженные металлические поверхности могут служить удобными моделями для исследования мембранных процессов. Кроме того, варьирование электрохимического потенциала на поверхности металла позволяет контролировать состояние групп атомов биомолекул, которые меняют свои окислительно-восстановительные свойства в процессе функционирования. Имеется также возможность фиксировать электро- и фотохимические превращения некоторых биомолекул, адсорбированных на поверхностях электродов или гидрозолей, что позволяет изучать отдельные стадии функционирования таких биологических соединений в стационарных условиях. Обширную информацию о применении усиленных поверхностью ИК-Фурье- и ГКР-спектроскопии в биологических исследованиях можно найти в обзорных работах [681–684]. Методы колебательной спектроскопии используют для изучения отдельных биологических молекул, целых клеток и тканей [685–689].

В большинстве перечисленных работ используют адсорбцию биологических молекул на металлических электродах или тонких пленках. Однако в последние годы наиболее широкое распространение получают методы, основанные на использовании для усиления сигнала коллоидных металлов (в основном золота и серебра) [435, 690–694]. Это усиление определяется гигантскими нелинейными локальными полями, образующимися в металлических кластерах [695, 696]. На основе этих методик разрабатываются варианты иммуноанализа с использованием АТ или АГ, сорбированных на золотых наночастицах [697–701].

Мы использовали метод абсорбционной ИК-Фурье спектроскопии с усилением на поверхности (surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, SEIRA) для разработки способа детекции биоспецифических взаимодействий в системе, когда один из участников реакции сорбирован на частицах КЗ. Этот метод было предложено называть *спектроиммунохимическим* [702].

Были приготовлены конъюгаты протеина А (Sigma, США) с КЗ со средним диаметром частиц 15 и 30 нм. Предварительные эксперименты показали, что лучшие результаты при регистрации SEIRA-спектров получались при использовании конъюгатов с КЗ диаметром 30 нм, поэтому в дальнейшем мы применяли только их. Чтобы избежать дополнительных полос в спектрах, при приготовлении конъюгатов вторичный стабилизатор не вносили. Концентрация протеина А в конъюгате составила 6 мкг/мл.

Проведение собственно биоспецифической реакции заключалось в следующем. К 5 мл конъюгата протеина А с КЗ ($A_{520} = 1,0$) добавляли примерно эквимоллярное количество (200 мкл) водного раствора человеческого IgG (Serva, Германия), или — в качестве контроля — BCA (Serva, Германия). Начальные концентрации обоих белков составляли 1 мг/мл. После инкубации в течение часа при комнатной температуре пробы центрифугировали 5 мин при 4°C и 12000 *g*. Затем супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 5 мл бидистиллированной воды и центрифугировали при тех же условиях.

Измерения проводили на ИК-Фурье спектрометре Magna IR 750 (Nicolet, США) с использованием метода ослабления полного внутреннего отражения на стандартных ZnSe подложках (Spectra-Tech, США). На подложки наносили 100 мкл водной суспензии осадка центрифугированной пробы (или растворов нативных протеина А и IgG) в виде полосы шириной ~ 3 мм по всей длине подложки и высушивали в сухо-воздушном термостате при 45°C 1 час. После этого проводили спектроскопические измерения образовавшейся сухой пленки с разрешением до 4 см⁻¹ с суммированием 100 разверток спектра на каждый образец. Спектроскопические данные обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения OMNIC 3.1 (Nicolet, США).

На рис. 7.8 приведен ИК-Фурье спектр нативного протеина А, представляющий собой типичный ИК-спектр белка, включающий полосы валентных колебаний групп N-H при 3290 и 3077 см⁻¹; симметричных и антисимметричных валентных колебаний групп CH₂ и CH₃ боковых цепей аминокислот (около 3000–2800 см⁻¹); характерные четкие полосы амид-I (C=O) и амид-II (N-

Н и C-N) пептидов (соответственно, 1652 и 1540 см^{-1}); полосу деформационных колебаний CH_2 (1453 см^{-1}); уширенные полосы C-NH₂ боковых цепей первичных аминов (около 1400 см^{-1}); слабые полосы C-N, C-O и C-C-O аминокислотных остатков (ниже 1350 см^{-1}) [703–706].

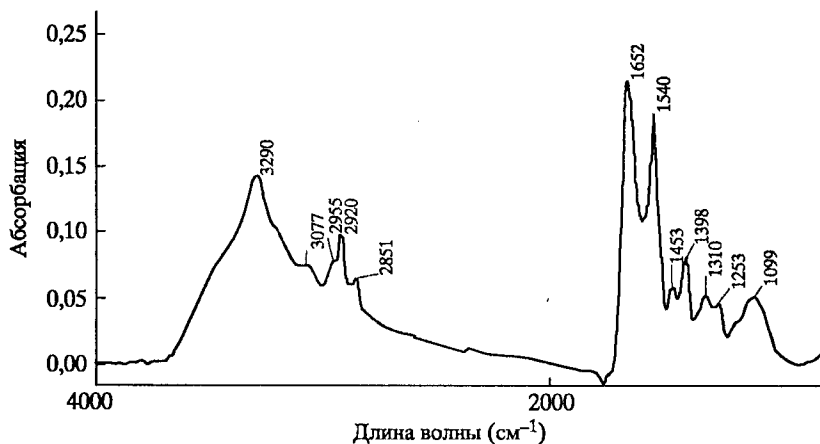


Рис. 7.8. ИК-Фурье спектр нативного протеина А (100 мкг белка)

Спектр протеина А, конъюгированного с КЗ (рис. 7.9), заметно отличается от спектра нативного белка. Во-первых, обращает на себя внимание, что количество протеина А в образце конъюгата с КЗ было примерно в 5 раз меньше, чем в образце нативного белка. Тем не менее, наблюдалось 2–3-х кратное увеличение интенсивности поглощения. Этот факт свидетельствует о том, что связывание белка с золотыми частицами в приведенной схеме измерения приводит к усилению поглощения в 10–15 раз (эффект SEIRA). Такое усиление согласуется с природой конъюгатов биомолекул с КЗ, обусловленной относительно слабыми нековалентными (электростатическими и гидрофобными) взаимодействиями, которые позволяют сохранить нативные свойства биомолекулы и ее функциональную активность. Как известно, ковалентная пришивка макромолекул к металлической поверхности приводит к более выраженному эффекту усиления [689]. Во-вторых, SEIRA-спектр конъюгата

протеина А с КЗ демонстрирует исчезновение полосы при 3290 см^{-1} и появление вместо двух полос амид-I (1652 см^{-1}) и амид-II (1540 см^{-1}) единственного промежуточного интенсивного пика при 1569 см^{-1} с небольшим плечом около 1650 см^{-1} . Эти изменения могут быть связаны с участием групп N-H во взаимодействии с поверхностью металлической частицы. Кроме того, усилены колебания боковых цепей аминокрупп C-NH_2 в области 1400 см^{-1} и C-C/C-O колебания ($1150\text{--}1000\text{ см}^{-1}$).

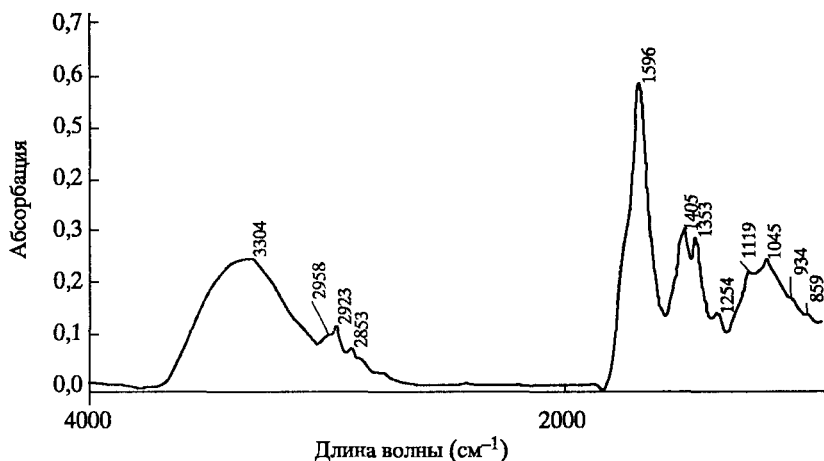


Рис. 7.9. SEIRA-спектр конъюгата протеина А с КЗ (20 мкг белка)

Выраженные изменения спектра протеина А, конъюгированного с КЗ, по сравнению со спектром нативного белка, служат прямым доказательством прикрепления биомолекул к поверхности золотых наночастиц, что может быть положено в основу метода контроля процессов биоконъюгации.

Другой существенный эффект был отмечен при биоспецифическом взаимодействии IgG с конъюгатом протеина А с КЗ. Он заключался в восстановлении основной формы спектра нативного протеина А с примерно 15-кратным усилением сигнала (рис. 7.10). Заметим, что ИК-Фурье спектр нативного IgG, представленный на рис. 7.11, несмотря на общее сходство со спектром протеина А (рис. 7.8), имеет существенные отличия. Основные из них:

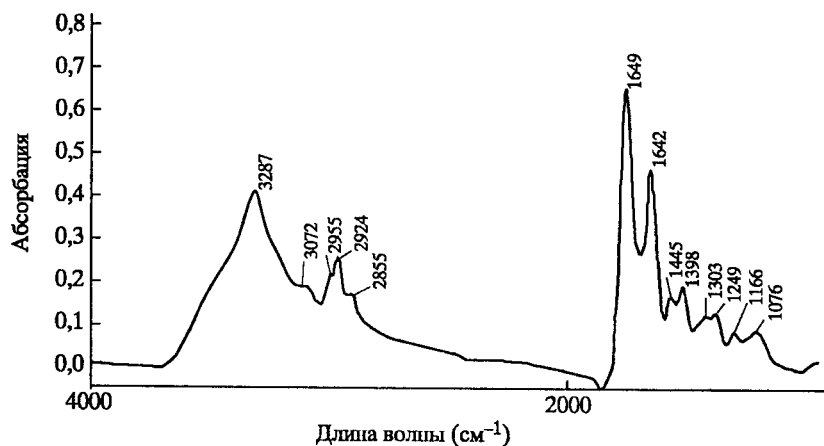


Рис. 7.10. SEIRA-спектр конъюгата протеина. А с КЗ после взаимодействия с IgG

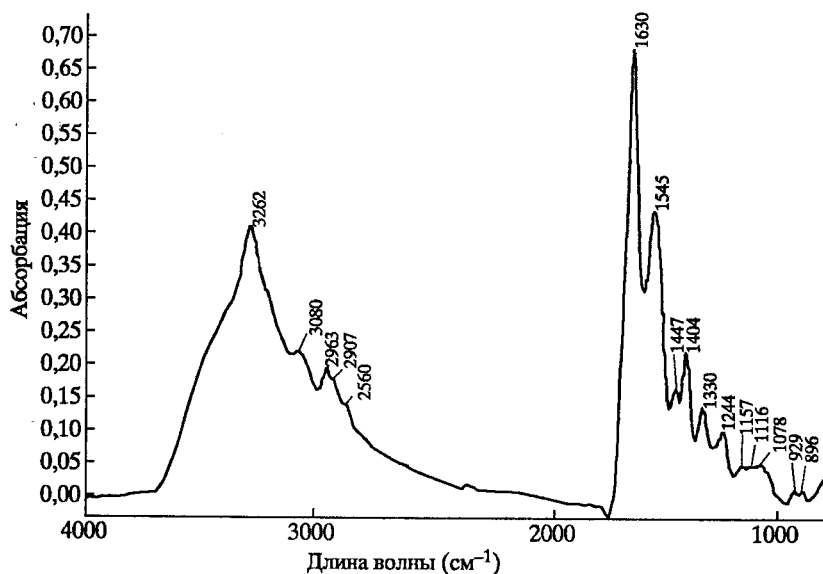


Рис. 7.11. ИК-Фурье спектр нативного IgG (100 мкг белка)

интенсивность полосы антисимметричных колебаний C–H метильных групп ($-\text{CH}_3$) при 2963 см^{-1} выше у IgG, тогда как у протеина А преобладает полоса при 2920 см^{-1} , соответствующая метиленовым группам ($-\text{CH}_2-$), что отражает различия их аминокислотного состава;

узкая полоса амид-I у IgG с максимумом при 1638 см^{-1} (с небольшим плечом около 1680 см^{-1}) характерна для β -структур [705, 706], типичных для иммуноглобулинов [699], в то время как у протеина А полоса амид-I обнаруживается при 1652 см^{-1} , что отражает преобладание во вторичной структуре α -спиралей.

Отметим, что добавление БСА в качестве контроля к конъюгату протеина А с КЗ не приводило к изменению спектров (они оставались аналогичными представленному на рис. 7.9).

Тот факт, что спектр комплекса (КЗ-протеин А)-IgG (рис. 7.10) в значительной степени аналогичен спектру нативного протеина А (рис. 7.8), но отличается от спектра конъюгата протеина А с КЗ (рис. 7.9), свидетельствует о произошедшем взаимодействии IgG с протеином А, сорбированном на золотых наночастицах. Это согласуется с результатами наших исследований реакций АГ–АТ, проведенных методом ГКР с использованием золотых наночастиц, и данными работы [699].

В заключение этого раздела отметим, что полученные результаты впервые продемонстрировали возможность применения SEIRA-спектроскопии сухих пленок золотых биоконъюгатов для чувствительного определения взаимодействия белковых молекул с поверхностью золотых частиц, а также для достоверной и простой регистрации биоспецифических реакций. Описанный метод может послужить основой для разработки тест-систем, детектирующих биоспецифические взаимодействия типа АГ–АТ, фермент-субстрат, лектин-полисахарид и т.п. Кроме того, обнаруженные нами изменения спектров биомолекул на золотых частицах являются доказательством того, что биомолекулы действительно адсорбированы на частицах. Этот факт особенно важен с точки зрения проблем контроля синтеза конъюгатов галтенов с КЗ, которое может быть использовано в качестве носителя для последующей иммунизации животных. Предложенный метод наряду с другими (например, ГКР) может быть использован для контроля качества таких конъюгатов.

8. ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ

8.1. Коллоидное золото как носитель антигенов для получения антител и производства вакцин

Остановимся коротко на двух взаимосвязанных проблемах современной иммунологии, привлекающих внимание огромного числа исследователей. Это получение АТ на неиммуногенные низкомолекулярные вещества (гаптены) и создание нового поколения вакцин на основе естественных (микробных) или синтетических пептидов [707–710].

Известно, что биосинтез АТ в организме индуцируют вещества, обладающие достаточно развитой структурой (иммуногенностью). К их числу принадлежат белки, полисахариды, некоторые синтетические полимеры [1]. Значительная же часть биологически активных веществ (нейромедиаторы, гормоны, витамины, антибиотики и т.д.) имеет относительно небольшую молекулярную массу. Низкомолекулярные АГ относятся к категории, так называемых, слабых АГ, т.е. против них выраженный иммунный ответ не развивается.

Интерес исследователей к получению АТ против гаптенов связан с рядом причин. Во-первых, АТ к отдельным участкам биомакромолекул являются высокоэффективным инструментом в исследовании их топографии и структуры. Во-вторых, такие низкомолекулярные соединения как антибиотики, гормоны, некоторые лекарственные препараты требуют постоянного контроля их содержания в крови больных, в мясных и молочных продуктах, в культуральных средах. Лекарственный мониторинг широко используется во всех развитых странах, что дает возможность существенно повысить эффективность лечения и

предотвратить появление осложнений. При наличии различных способов обнаружения подобных веществ, наиболее доступными и высокочувствительными остаются методы иммунохимического анализа, которые подразумевают получение АТ к этим низкомолекулярным соединениям. В-третьих, синтетические пептиды пытаются использовать для конструирования искусственных (ацеллюлярных) вакцин, содержащих только протективные АГ и инертный носитель. Кроме того, очень перспективным представляется использование АТ к низкомолекулярным соединениям в иммунотерапевтической практике [707, 711].

Поскольку гаптены обладают слабой иммуногенностью, важной задачей при получении АТ к низкомолекулярным соединениям является подбор оптимального *носителя* (системы доставки), обеспечивающего высокий иммунный ответ и, вместе с тем, получение достаточно чистых препаратов АТ. Традиционно (со времен К. Ландштейнера) эта задача решается с помощью химического присоединения гаптена к белковой матрице — шлепперу (от нем. schleppen — тащить, буксировать), использованием адъювантов и напряженных схем иммунизации животных полученным конъюгатом [707, 712]. В качестве шлепперов обычно используют бычий сывороточный альбумин, овальбумин, тиреоглобулин, гемоцианин, дифтерийный или столбнячный анатоксины (для синтетических пептидов) и др. Однако, при этом образуются АТ, как против гаптена, так и против иммунодетерминантных участков носителя. Причем далеко не всегда при использовании подобного носителя развивается выраженный иммунный ответ на слабые АГ. Кроме того, последующая очистка и скрининг получаемых АТ трудоемки и дороги, а их титр и аффинность зачастую оказываются низкими. Большинство применяемых ныне адъювантов на основе масляных эмульсий и суспензий неорганических веществ, как правило, склонны к расслоению фаз, часто реактогенны, их иммуногенные свойства изменяются со временем, многие из таких адъювантов вызывают локальные и системные токсические явления [713, 714]. Казалось бы, наиболее перспективным решением проблемы получения АТ против гаптенот является использование фагового

дисплея АГ [715], однако эта методика в настоящее время практически неприменима в вакцинологии.

В последние годы ведутся работы по созданию, так называемых, комплексных АГ, т.е. таких искусственных макромолекулярных комплексов, в состав которых входят как необходимые антигенные детерминанты, так и носители и/или адъюванты. В качестве последних были предложены, в частности, *синтетические полиэлектролиты* (поли-L-лизин, полиакриловая кислота, поливинилпиридин, полистиренсульфонат, фиколл и др.) [716]. Так, с использованием поликатионита "полиоксидоний" была разработана противогриппозная вакцина "Гриппол". Указанные полимерные соединения получают методом радикальной полимеризации соответствующих мономеров [717]. Простота химического синтеза и строения полиэлектролитов, возможность получения полимерных цепочек в широком диапазоне молекулярных масс (т.е. различной длины), растворимость в воде и другие свойства (способность к конформационным превращениям, образование комплексов с белками и др.) открыли возможности для их использования в иммунологических исследованиях [718]. Такие *носители-адъюванты* способны депонировать АГ в местах введения, усиливать презентацию АГ иммунокомпетентным клеткам и индуцировать продукцию необходимых цитокинов. Однако, невысокая иммуногенность таких комплексов, обусловленная малой эпитопной плотностью, побуждает исследователей к поиску новых нетоксичных и эффективных носителей, обладающих к тому же адъювантными свойствами.

Особо перспективными в этом отношении, на наш взгляд, представляются *корпускулярные носители нанометровых размеров*: полимерные наночастицы (например, полиметилметакрилатные) [719], липосомы, протеосомы и микрокапсулы [720–722], фуллерены [723, 724], углеродные нанотрубки [725] и др. При их использовании меняются формы проявления иммуногенности заданного вещества в иммунной системе организма хозяина. АГ, адсорбированный или инкапсулированный наночастицами, может использоваться в качестве адъюванта для оптимизации иммунного ответа организма при вакцинации. Так,

например, анализ динамики иммунного ответа показал, что титр АТ в ответ на АГ, введенный с фуллеренами, был равным титру АТ на АГ, введенный с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), и превышал титр АТ в ответ на АГ, введенный без адъюванта, примерно на порядок.

В 1986 г. в пионерской работе японских исследователей [726] появились сведения об успешной попытке получения АТ к глютаминовой кислоте с использованием в качестве носителя частиц КЗ. (Справедливости ради, необходимо отметить, что коллоидные металлы использовали для стимуляции иммунного ответа на гаптены и полноценные антигены еще в двадцатых годах прошлого века Л.А Зильбером и др. [727–729].) После этого вышло весьма небольшое, на наш взгляд (несмотря на тщательный литературный поиск), количество работ, авторы которых применяли и развивали этот метод для получения АТ к следующим гаптенам и полноценным АГ: аминокислотам [730–732], фактору активации тромбоцитов [733, 734], хинолиновой кислоте [735], иммунофиллину [736], лизофосфатидной кислоте [737], эндостатину [738], пептидам капсида вируса гепатита С [739], поверхностным АГ бруцелл [740]. Во всех перечисленных работах гаптен непосредственно конъюгировали с частицами КЗ, смешивали с ПАФ и иммунизировали животных. В результате получали антисыворотки с высоким титром, которые не требовали дальнейшей очистки от балластных АТ.

В 1993 г. вышла работа австралийских ученых [741], в которой они предложили перед конъюгированием с КЗ присоединять гаптены к белку-носителю. Это предложение нашло поддержку в работах по получению АТ к ряду синтетических [742–745] и природных [746] пептидов, аминокислотам [747, 748], цитруллину [749], фенил- β -D-тиоглюкорониду [750]. В качестве адъювантов в этих работах использовали ПАФ или N-ацетимуромил-L-аланил-D-изоглутамин [743]. АТ, полученные предложенным способом, обладали высокой специфичностью к исследованным АГ и более высоким титром (по выражению авторов работы [741], “чрезвычайно высоким”) – от 1:250000 до 1:1000000 по сравнению с АТ, полученными рутинным способом (конъюгацией со шлеппером).

В 1996 г. была опубликована статья, а в 1997 г. — патент сотрудников Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, в которых они впервые показали возможность использования частиц КЗ в составе антивирусной вакцины как носителей белкового АГ капсида вируса клещевого энцефалита [751, 752]. По данным авторов, несмотря на то, что в состав вакцины не входили адъюванты, предложенная экспериментальная вакцина обладала более высокими протективными свойствами по сравнению с коммерческими аналогами.

В 2003 г. вышла статья [753], авторы которой предложили новый способ получения АТ против $A\beta$ -пептида — молекулярного маркера болезни Альцгеймера. Ковалентно пришив предварительно тиолированные олигомеры к поверхности золотых частиц, авторы создали молекулярную имитацию фибриллярной формы $A\beta$ -пептидов. АТ, полученные на синтезированный таким способом АГ, обладали очень высокой специфичностью и аффинностью как к растворимой, так и к фибриллярной форме $A\beta$ -пептидов.

В то же время, появилось значительное количество работ, посвященных использованию частиц КЗ для создания *ДНК-вакцин*. Принцип ДНК-иммунизации заключается в следующем: в организм вводятся генные конструкции, кодирующие белки, к которым необходимо получить АТ. В случае эффективной экспрессии генов эти белки служат АГ для развития иммунного ответа [754, 755]. В первых работах иммунизацию проводили с помощью подкожной или внутримышечной инъекции “голой” ДНК. Однако практически сразу с этой целью начали использовать баллистическую трансфекцию с использованием частиц КЗ, которая оказалась очень эффективной, по всей видимости, вследствие множественности мест взаимодействия трансгена с тканями, проникновения непосредственно внутрь клеток и ядер. Следует отметить, что толчком к использованию генной терапии и иммунизации, в том числе, послужил и способ синтеза КЗ, предложенный Гойей и Матиевичем в 1999 г., позволяющий получать монодисперсные сферические частицы с диаметром от 80 нм до 5 мкм [162, 756].

Метод генной иммунизации, часто называемой ДНК-вакцинацией, подробно разработанный в опытах на животных, показал высокую эффективность, особенно в отношении вирусных инфекций — клещевого энцефалита, ВИЧ-инфекции, гепатита В и некоторых других.

ДНК-иммунизация имеет ряд преимуществ по сравнению с обычной вакцинацией. Один рекомбинантный вектор может направлять синтез нескольких АГ одновременно, что уменьшает число отдельных иммунизаций. При этом снимаются проблемы, связанные с трудностями проникновения в организм белка, и значительно снижается риск побочных эффектов, которые зависят от токсичности вводимых при обычной иммунизации балластных белков или вирулентности используемых бактерий и вирусов. Можно ожидать, что в ближайшие годы именно ДНК-иммунизация окажется в числе наиболее эффективных методов генной терапии [54, 757, 758].

В последнее время при проведении ДНК-вакцинации практически отказались от введения внутримышечно “голой” ДНК. В качестве носителя генетического материала стали использовать наночастицы, а инъекционный материал вводить подкожно, внутрикожно, накожно, интраназально [759, 760]. Особой популярностью среди наночастиц-носителей ДНК пользуются частицы КЗ (причем, как сферической, так и, в последнее время, цилиндрической формы — мультивалентные Au-Ni наностержни) [258, 761–766]. Причем, если раньше золото использовалось только как носитель, то авторами работы [767] было отмечено: “...Хотя принцип этого явления пока не ясен, несомненно — золото сильно усиливает иммунный ответ *in vivo*”. Также хочется обратить внимание на обзор [768], который посвящен изучению чувствительности организма млекопитающих к введению металлического золота. В частности, в обзоре отмечено, что инъекционное введение лабораторным животным КЗ может приводить к воспалительным реакциям, накоплению золота в ретикулярных клетках лимфоидной ткани, активации клеточного и гуморального иммунитета. Однако, ни в одной из доступных нам работ мы не нашли сведений о механизмах подобного действия золотых частиц.

8.2. Адъювантные свойства золотых наночастиц

Напомним, что получение АТ к низкомолекулярным и низкоиммуногенным АГ остается одной из самых актуальных задач современной иммунологии. Это объясняется тем, что иммунохимические тест-системы являются одним из самых удобных методов (зачастую единственным) мониторинга таких соединений, как антибиотики, гормоны, витамины, нейромедиаторы, пестициды и др. в крови людей и животных, в мясных и молочных продуктах, в культуральных средах. Кроме того, в исследовании топографии и структуры биомакромолекул АТ к их отдельным участкам являются незаменимым инструментом. Весьма перспективным видится использование АТ к низкомолекулярным соединениям в иммунотерапевтической практике.

Как известно, с 1986 г. КЗ используется в качестве носителя гаптенa при иммунизации животных для получения АТ [726]. Однако, мы не нашли в доступной нам литературе сведений о *механизме* антителообразования при таком способе иммунизации. Это дало нам основания для постановки экспериментов, имеющих целью оценку эффективности КЗ как средства получения АТ к разнообразным АГ и получение сведений, позволяющих судить о механизме их биосинтеза.

Первым АГ, использованным нами для отработки методики, был выбран биотин (витамин Н) [769]. Известно, что биотин высокоспецифично взаимодействует с гликопротеином яичного белка авидином или с мембранным белком *Streptomyces avidini* — стрептавидином ($K_d = 10^{-15}$ М). При этом для такого взаимодействия требуется только уреидное кольцо витамина (рис. 8.1), а карбоксильную группу остатка валериановой кислоты в биотине можно модифицировать и таким образом получать активные биотинилированные производные белков и нуклеиновых кислот [770]. При этом биотин, связанный с макромолекулой, сохраняет способность взаимодействовать с активным центром авидина. В последнее время система авидин-биотин нашла широкое применение в практике работ по обнаружению, локализации и очистке белков [770], исследованию генетических структур

с использованием олиго- и полинуклеотидных зондов (методы молекулярной гибридизации) [771, 772], в иммуноанализе [2] и т.п. При этом используют различные метки: ферменты, хемилюминесцентные соединения, флуорофоры, коллоидные частицы. В качестве дополнения (альтернативы) применению авидина или стрептавидина могут быть использованы антибиотиновые АТ [533, 773]. Однако их получение сопряжено с отмеченными выше трудностями получения АТ к гаптенам.

Наши предварительные эксперименты показали, например, неэффективность традиционного подхода — иммунизации кроликов препаратами конъюгата биотина с БСА. Поэтому при иммунизации животных биотином в качестве носителя были использованы частицы КЗ. Для этого синтезировали КЗ

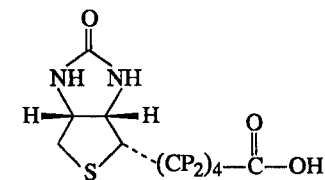


Рис. 8.1. Структурная формула биотина

со средним диаметром частиц 15 нм по методу Френса. Значения рН золя и раствора биотина с концентрацией 5 мг/мл доводили до 9,0 и 9,5 соответственно, используя 0,2 М водный раствор K_2CO_3 . Затем компоненты смешивали в соотношении 1:1. Об устойчивости комплекса судили по отсутствию агрегации (изменения цвета раствора) при добавлении NaCl до концентрации 0,5%. Далее, 1,0 мл раствора стабильного комплекса смешивали с 1,0 мл ПАФ. Затем полученную эмульсию (1,0 мл) вводили дробно подкожно кролику в дозе 0,1 мл на одну точку. Эту процедуру повторяли 4 раза с интервалом в 2 недели. Таким образом, доза адьюванта на одну инъекцию составляла 50 мкл, а общее количество адьюванта в процессе иммунизации не превысило 0,5 мл.

Спустя 10 дней после последней инъекции кровь собирали и отделяли сыворотку. Фракцию иммуноглобулинов получали высаливанием сульфатом аммония. Затем проводили выделение фракции IgG с помощью высокоэффективной жидкостной анионообменной хроматографии на колонке Моно-Q в системе FPLC (Pharmacia, Швеция). Проверку полученных АТ осуществляли методами колец преципитации, двойной иммунодиф-

фузии и дот-анализа с использованием непрямого метода выявления связавшихся антител протеином А, меченым КЗ. В качестве модельной системы применяли биотинилированный БСА, полученный согласно [770]. В качестве контроля использовали не меченый биотином БСА.

Реакция иммунопреципитации показала четко визуализируемое кольцо с биотинилированным БСА. Метод двойной иммунодиффузии позволил обнаружить преципитаты при разведении исходной сыворотки 1:32.

На рис. 8.2 представлены результаты дот-анализа, проводимого в следующем порядке. На нитроцеллюлозную мембрану наносили двойные разведения биотинилированного БСА (начальная концентрация 1,0 мг/мл). Затем верхнюю полосу инкубировали в растворе меченого КЗ стрептавидина ($A_{520} = 0,5$). Нижнюю полосу инкубировали в растворе антибиотиновых АТ с концентрацией 10 мкг/мл в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем результат реакции детектировали протеином А, меченым КЗ ($A_{520} = 0,5$). Как можно видеть на рисунке, опыты с антибиотиновыми АТ показали большую чувствительность к выявлению биотина по сравнению со стрептавидином, что хорошо согласуется с данными работ [533, 773].

На следующем этапе нашей работы для иммунизации животных был использован конъюгат КЗ с полноценным АГ. В качестве такового был выбран АГ клеточной стенки бактерий *Y. pseudotuberculosis*. Выбор был обусловлен тем, что псевдотуберкулез, или экстраинтестинальный иерсиниоз, относится к числу инфекций, широко распространенных как в нашей стране, так и за рубежом [774, 775]. Это, в первую очередь, обусловлено выраженной адаптационной способностью возбудителя [776]. Исследования последнего десятилетия позволяют говорить о практически повсеместном распространении этой инфекции в России. Однако число публикаций по разработке средств диагностики и профилактики иерсиниоза, на наш взгляд, пока невелико.

Проблема диагностики иерсиниоза в настоящее время приобрела особую актуальность, поскольку неуклонный рост заболеваемости людей и животных, в том числе домашних, делают необходимым всестороннее изучение этой нозологической фор-

мы [777, 778]. Одним из наиболее совершенных диагностических приемов, по нашему мнению, являются иммунохимические методы, основанные на использовании АТ, высокоспецифичных к возбудителю.

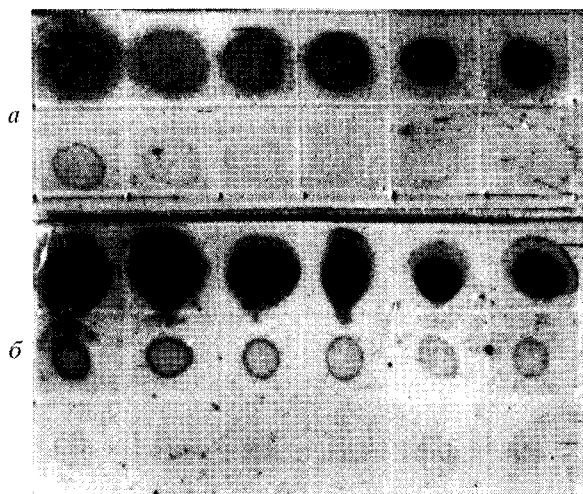


Рис. 8.2. Результаты дот-анализа биотинилированного БСА маркерами стрептавидин + КЗ (а) и антибиотиновые АТ, выявленные конъюгатом протеин А + КЗ (б). Начальная концентрация белка 1,0 мг/мл

Целью работы, результаты которой изложены ниже, являлось определение эффективности КЗ как адьюванта, используемого для получения специфических АТ к поверхностным белкам *Y. pseudotuberculosis*, а также изучение его влияния на ферментативную и фагоцитарную активность лейкоцитов в процессе иммунизации животных.

Для получения специфических АТ был использован АГ клеточной стенки бактерий *Y. pseudotuberculosis*. Бактериальную массу смывали с поверхности агара и разводили физиологическим раствором до концентрации 10^9 микробных клеток в мл. Полученную взвесь обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин и центрифугировали при 18000 об/мин 30 мин при 4°C . Надосадочную жидкость декантировали и наносили на ионообменную колонку. Хроматографию проводили в 0,1 М Трис-НСl

буфере (рН 8,5) в градиенте от 0 до 1 М NaCl. При хроматографии выделялось 5 фракций.

Иммунологическую активность полученных АГ определяли методом иммунодот-анализа с поливалентной иерсиниозной сывороткой. В качестве детектирующего агента использовали протеин А, меченный КЗ. Белковый АГ фракции, обнаружившей наибольший отклик в дот-анализе, конъюгировали с КЗ. Процедуру получения конъюгатов КЗ с иерсиниозным АГ выполняли при рН 5,6, минимальное защитное количество белка составило 10 мкг на 1 мл золя.

Иммунизировали шестерых половозрелых кроликов породы шиншилла. Животных разделили на три группы — по два в каждой. Первую группу иммунизировали 100 мкл конъюгата АГ с КЗ (таким образом, инъекционная доза составляла 1 мкг АГ). Вторую группу иммунизировали 100 мкг АГ, разведенного в физиологическом растворе и эмульгированного в 100 мкл ПАФ. Третью, контрольную группу, иммунизировали 100 мкг АГ, разведенного в физиологическом растворе. Препараты с КЗ и физиологическим раствором вводили внутримышечно, с ПАФ — подкожно. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 2 недели. После второй иммунизации проводилась реиммунизация (“бустирование” — введение нативного АГ без адъювантов). Забор крови проводили из ушной вены через неделю после каждой иммунизации. Титр АГ определяли в реакции гемагглютинации по общепринятой методике [779].

Ферментативную активность лимфоидных клеток крови (щелочную и кислую фосфатазу) определяли методами Кеплоу и Берстона [780]. Фагоцитарную активность оценивали по содержанию катионного белка методом Шубича и тестом восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) по Парку [780].

В табл. 8.1 приведены данные, характеризующие изменения титра АТ при иммунизации по различным схемам. Через неделю после первой иммунизации титр АТ составлял 1:32 в опытных группах (с использованием ПАФ или КЗ) и 1:2 в контрольной группе (без использования адъювантов). После второй иммунизации титры АТ во всех группах увеличились в восемь раз и составили во второй и первой группе 1:256, а в третьей группе 1:16.

Основные результаты были получены после реиммунизации. Во второй группе, где в качестве адьюванта был использован ПАФ, титр АТ увеличился до 1:10240. В эксперименте, где в качестве адьюванта было использовано КЗ, титр также составил 1:10240. Однако иммунизационная доза была при этом на два порядка меньше. При введении АГ с физиологическим раствором титр составил 1:512.

Таблица 8.1

Показатели титров антител в процессе иммунизации кроликов иерсиниозным антигеном

Препарат	1-я иммунизация	2-я иммунизация	Реиммунизация
КЗ + АГ	1:32	1:256	1:10240
ПАФ + АГ	1:32	1:256	1:10240
Физ. р-р + АГ	1:2	1:16	1:512

В табл. 8.2 показано изменение ферментативной активности клеток лимфоидного ряда кроликов при иммунизации их АГ, вводимыми с различными адьювантами. Можно отметить незначительное увеличение активности кислой и щелочной фосфатазы в лимфоидных клетках как при введении АГ, растворенного в физиологическом растворе, так и при иммунизации АГ, с использованием ПАФ или КЗ. Данные показатели, по-видимому, являются нормальной реакцией организма при формировании иммунного ответа.

Изучение фагоцитарной активности лимфоидных клеток проводили с учетом способности клеток восстанавливать зерно формазана в тесте с нитротетразолевым синим и по образованию катионного белка в цитоплазме лимфоцитов (табл. 8.3). В качестве контроля в табл. 8.2 и 8.3 приведены параметры сыворотки неиммунизированных кроликов.

Таблица 8.2

Показатели изменения кислой (КФ)
и щелочной (ЩФ) фосфатаз в процессе иммунизации

Назва- ние препа- рата	1 иммунизация		2 иммунизация		Реиммунизация	
	КФ, ед.	ЩФ, ед.	КФ, ед.	ЩФ, ед.	КФ, ед.	ЩФ, ед.
КЗ+АГ	195±2,8	118±0,9	230±3	100±0,9	250±3,1	140±0,85
ПАФ+АГ	217±3	148±1	239±3,1	160±0,83	225±2,8	150±0,9
Физ. р-р +АГ	160±2,8	140±1	235±2,82	161±1	222±3	150±0,9
Контроль	90±1,8	100±1	87±1	100±1	90±1,8	95±1

Таблица 8.3

Показатели изменения активности катионного белка (КБ) и
восстановления формазана в НСТ-тесте в процессе
иммунизации

Название препа- рата	1 иммунизация		2 иммунизация		3 иммунизация	
	КБ	НСТ	КБ	НСТ	КБ	НСТ
КЗ+АГ	255±1,4	92±0,5	291±0,9	118±0,4	300±1,2	120±0,6
ПАФ+АГ	153±1	62±0,6	175±0,9	113±0,4	160±1,2	113±0,6
Физ. р-р +АГ	120±0,9	50±0,6	175±1,2	100±0,5	130±1,2	110±0,4
Контроль	110±1	50±1	115±1	50±1	115±1	49±1

Полученные результаты свидетельствуют о способности КЗ стимулировать образование АТ при иммунизации АГ клеточной стенки микробных клеток. На это указывает повышение активности как катионных белков клеток нейтрофильного ряда, так и повышенная активность данных клеток в восстановлении зерен формазана при проведении НСТ-теста. ПАФ в данном случае стимулирует аналогичную или даже более низкую реакцию. Усиленный фагоцитоз частиц макрофагами, как нам представляется, вполне может быть ответственным за адьювантный эффект.

Таким образом, при использовании КЗ в качестве адьюванта титр АТ был таким же высоким, как и при использовании ПАФ, хотя количество вводимого АГ было на два порядка ниже. Изменение ферментативной активности лимфоидных клеток было незначительным при применении в качестве адьюванта как КЗ, так и ПАФ, а также физиологического раствора. КЗ, использованное в качестве адьюванта, активирует фагоцитарную активность лимфоидных клеток, что подтверждается в реакции с нитротетразолевым синим и усилением активности катионного белка в гранулоцитах.

Приведенные данные показывают эффективность использования КЗ в качестве адьюванта при получении иммунной сыворотки против полноценного АГ [781].

На следующем этапе мы получали АТ к слабоиммуногенному высокомолекулярному АГ — БСА и оценивали при этом факторы естественной клеточной и гуморальной резистенции организма крыс.

Для иммунизации использовали половозрелых крыс-самок. Непосредственно перед иммунизацией конъюгат БСА с КЗ смешивали в соотношении 1:1 с ПАФ. Полученную эмульсию вводили крысам внутрибрюшинно. Инъекции повторяли 4-кратно с интервалом 2 недели. Спустя 10 суток после последней инъекции производили отбор крови и отделение сыворотки. Фракцию иммуноглобулинов получали высаливанием сульфатом аммония согласно [782]. Альтернативно животных иммунизировали АГ, конъюгированным с КЗ, АГ в смеси с ПАФ и АГ, растворенным в физрастворе.

Через 10 суток после второй, третьей и четвертой иммунизации у подопытных животных производили забор крови и проводили оценку факторов естественной клеточной и гуморальной резистенции. Тесты, определяющие функциональную и бактерицидную активность фагоцитов, содержание в сыворотке лизоцима и комплемента проводили по методикам [783].

Табл. 8.4 демонстрирует нарастание титра сывороток в процессе иммунизации крыс БСА по описанным выше схемам. Обращает на себя внимание тот факт, что максимальный титр после окончания иммунизации оказался у сыворотки, полученной при введении конъюгата БСА + КЗ без использования ПАФ.

Таблица 8.4

Изменения титров сывороток в процессе иммунизации крыс БСА

Название препарата	2 иммуни- зация	3 иммуни- зация	4 иммуни- зация
БСА + КЗ	1:128	1:2560	1:6400
БСА + ПАФ	1:128	1:2560	1:3200
БСА	1:128	1:1280	1:2560

Анализ изменений неспецифических факторов клеточной и гуморальной резистенции в процессе иммунизации крыс БСА по различным схемам показал, что КЗ, использованное в качестве носителя АГ, активирует фагоцитарную активность лимфоидных клеток, что, возможно, и определяет его иммуномодулирующий эффект.

Задачей следующего этапа настоящей работы была оценка эффективности использования КЗ как средства получения АТ *in vivo* на возможно большем количестве АГ различной природы

с целью унифицирования методики и выяснения адьювантных свойств КЗ.

В качестве полноценных АГ использовали высокомолекулярные АГ: бактериородопсин — хромопротеид, выделяемый из мембраны *Halobacterium halobium* (ИБХ РАН) и гладкомышечный актин из желудков кур (ИБФРМ РАН). Ряд антибиотиков, различных по химическому составу, таких, как левомецетин, гентамицин, неомицин, канамицин, ивермектин и тилмикозин (ЗАО “НИТА-ФАРМ”, Саратов) использовали для иммунизации как гаптены. Кроме того, использовали три синтетических пептида бактериородопсина, синтетический пептид из с-мус протоонкогена человека (в дальнейшем — “с-мус пептид” — tButioCys-Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) (ИБХ РАН), два синтетических пептида тропонина (Medix Biochemica, Финляндия), фитогормон индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) (Sigma, США). Характеристики АГ, использованных нами при иммунизации животных, приведены в табл. 8.5.

Самым удивительным результатом явилось то, что на все использованные АГ (за исключением пептида 1 тропонина) были получены АТ с достаточно высоким титром, который варьировал для различных АГ от 1:6400 до 1:51200.

Наибольшие сложности были связаны с “посадкой” гаптен на золотые частицы. В частности, поскольку ивермектин и тилмикозин практически не растворимы в воде, конъюгацию КЗ с этими веществами проводили в растворе полипропиленгликоля. Кроме того, не все гаптены оказывали стабилизирующее действие на золь золота, что выражалось в том, что золотое число определить было невозможно. В таких случаях мы смешивали 0,1–0,5% растворы гаптен и КЗ в соотношении 1:1. Таким образом, количество использованного на каждую инъекцию АГ варьировало в пределах от 0,2 до 125 мкг (табл. 8.5). Тем не менее, эти количества были меньше таковых при использовании конъюгатов гаптен с белками или полноценных АГ. Возможно, что единственный отрицательный результат иммунизации (пептид I тропонина) был связан с самой низкой иммунизационной дозой — 0,2 мкг, несмотря на то, что по своей структуре он должен давать более выражен-

Таблица 8.5

Характеристика антигенов, использованных при иммунизации

Антиген	Животное	pH	Золотое число, мкг/мл	Количество АГ на одну инъекцию, мкг
1	2	3	4	5
Биотин	Кролик	9,0	—	125
Пептид 1 бактерио- родопсина	Мышь	10	-	25
Пептид 2 бактерио- родопсина	Мышь	6	-	25
Пептид 3 бактерио- родопсина	Мышь	5,5	10	0,5
Левомецитин	Мышь	10	-	25
Гентамицин	Мышь	10	-	25
Неомицин	Мышь	10	-	25
Канамицин	Мышь	10	-	25
Ивермектин	Мышь	10	15	0,75
Тилмикозин	Мышь	11	8	0,4

Таблица 8.5. (Продолжение)

1	2	3	4	5
C-тус пептид	Мышь	6	5	0,3
ИУК	Кролик	6	-	125
Пептид 1 тропонина	Кролик	8	3	0,2
Пептид 2 тропонина	Кролик	10	6	0,35
Бактерио-родопсин	Мышь	10	5	0,25
БСА	Крыса	6	10	0,5
Актин	Кролик	6	10	0,5
Поверхностный АГ <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Кролик	6	10	0,5

ный иммунный ответ, чем пептид II, согласно [784] (пептид I — H-Tyr-Ala-Thr-Glu-Pro-His-Ala-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Ile-Ser-Ala-Ser-Arg-Lys-Leu-Gln-Leu-Lys-Thr-Leu-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Arg-Glu-Ala-Glu-Glu-Arg-Arg-Gly-Glu-Lys-Gly-Arg-OH; пептид II — H-Lys-Gly-Arg-Ala-Leu-Ser-Thr-Arg-Cys-Gln-Pro-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Leu-Gly-Phe-Ala-Glu-Leu-Gln-Asp-Leu-Cys-Arg-Gln-Leu-His-Ala-Arg-Val-Asp-Lys-Val-Asp-Glu-Glu-Arg-Tyr-OH).

На рис. 8.3 и 8.4 приведены результаты иммунозолотого дот-анализа с-тус пептида и актина с применением АГ, полученных различными способами: иммунизацией нативным АГ, иммунизацией нативным АГ с использованием ПАФ, иммунизацией конъюгатом АГ с КЗ, иммунизацией конъюгатом АГ с КЗ с использованием ПАФ, иммунизацией конъюгатом АГ с БСА (для пептида).

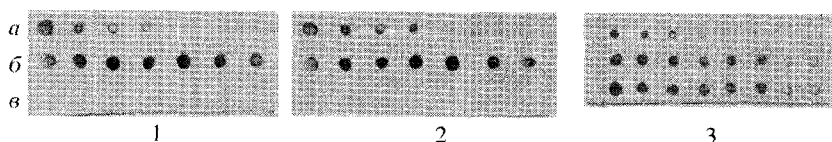


Рис. 8.3. Результаты дот-анализа с-тус пептида (а), конъюгата с-тус пептида с БСА (б) и БСА (в). Выявляющие сыворотки получены при иммунизации мышей конъюгатом с-тус пептида с КЗ без использования ПАФ (1), с использованием ПАФ (2), конъюгатом с-тус пептида с БСА с использованием ПАФ (3)

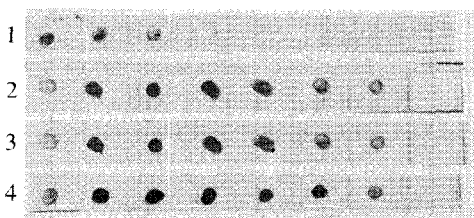


Рис. 8.4. Результаты дот-анализа куриного G-актина конъюгатом КЗ с антиактиновыми АГ. АГ получены иммунизацией мышей нативным актином (1), актином с использованием ПАФ (2), конъюгатом актина с КЗ (3) и конъюгатом актина с КЗ с использованием ПАФ (4)

Необходимо отметить, что при проведении дот-анализа мы столкнулись с трудностями, связанными с посадкой на НЦ-фильтры низкомолекулярных веществ. Поэтому некоторые гаптены мы выявляли с использованием ПВДФ- мембран, а пептид тропонина нам удалось выявить только с применением метода меченого АГ (рис. 8.5), т.е. на мембрану наносили двойные разведения иммунной сыворотки и визуализировали ее АГ, меченым КЗ.

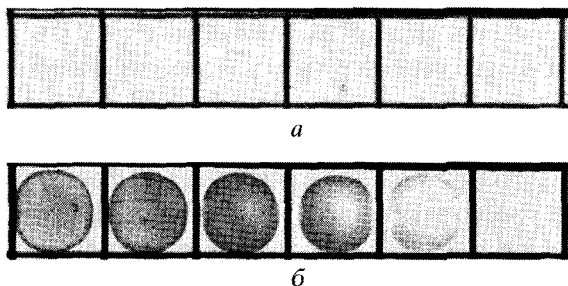


Рис. 8.5. Результаты дот-анализа мышинных сывороток, полученных на конъюгат пептида 1 (а) и пептида 2 (б) тропонина с КЗ. Выявление сывороток (двойные разведения, начальная концентрация 1мг/мл) проводили конъюгатами, использованными для иммунизации. Контрольный дот-анализ показал отсутствие перекрестов между сыворотками

Результаты, приведенные на рис. 8.3 и 8.4 показывают, что минимальное выявляемое количество АГ (как гаптена, так и полноценного АГ) в дот-анализе с использованием сывороток, полученных с применением КЗ, по крайней мере, не ниже такого при использовании сывороток, полученных рутинным способом. При иммунизации мышей *s-tus* пептидом с использованием или без использования ПАФ положительного ответа мы не получили. Обращает на себя внимание тот факт, что при использовании конъюгатов АГ с КЗ ответ обнаруживался даже без использования ПАФ. Данное наблюдение подтверждает, на наш взгляд, наличие у золотых частиц иммуномодулирующих (адьювантных) свойств [785, 786].

Таким образом, полученные экспериментальные результаты дают основания констатировать что:

с помощью метода “золотой иммунизации” можно получать АГ к гаптенам, в частности, к антибиотикам, витаминам и неиммуногенным пептидам, к которым традиционным способом получить АГ весьма затруднительно;

количество АГ, использованного в этом случае для иммунизации, намного меньше такового при традиционных методах, даже когда с их помощью удастся получить иммунный ответ;

в опытах с *s-тус*, БСА и бактериальным АГ получен иммунный ответ без использования других адъювантов.

Кроме того, напомним об “экстремально высоком титре” АГ при иммунизации конъюгатом гаптен-белок + КЗ, отмеченном в работе [741].

На наш взгляд, все вышеприведенные факты достаточно убедительно свидетельствуют о наличии у КЗ адъювантных свойств. При этом возникает вопрос о механизме подобного действия золотых наночастиц. Развитие исследований в этом направлении нам показалось целесообразным начать с оценок взаимодействия золотых наночастиц с клетками иммунной системы *ex vivo*.

Было исследовано непосредственное влияние частиц КЗ (без АГ) на культуру лимфоидных клеток в реакции бласттрансформации. Данная реакция является показателем общей иммунологической реактивности организма и косвенно свидетельствует о потенциальной способности иммунной системы к реакциям на АГ [1]. Индуцированная АГ активация и дифференциация Т- и В-клеток обычно происходит в лимфоидных тканях и может быть воспроизведена *in vitro* при культивировании лимфоцитов в присутствии активирующего агента. Такими агентами могут служить, в частности, бактериальные ЛПС и лектины (чаще всего, фитогемагглютинин (ФГА) и Con A). Лектины стимулируют Т-лимфоциты, а ЛПС — В-клетки. Активация лимфоцитов — необходимый этап в формировании иммунного ответа.

Мы оценили влияние частиц КЗ диаметром 15 и 60 нм на реакцию бласттрансформации лимфоцитов в присутствии ФГА (“Реахим”, Чехия) и ЛПС *Pseudomonas aerogenosa* (ИБХ РАН). Лимфоциты выделяли по общепринятой методике из цельной бараньей крови [783]. Бласттрансформацию проводили по методике, описанной в [783]. Полученные данные приведены в табл. 8.6. Как можно видеть, наблюдается увеличение процента бласттрансформированных лимфоцитов при добавлении КЗ. Так, при использовании ФГА с добавлением КЗ с размером частиц 15 нм количество бласттрансформированных лимфоцитов увеличилось на 11%, а с добавлением КЗ с размером частиц 60 нм — на 20%, в отличие от использования ФГА без добавления КЗ в

контроле. При использовании ЛПС с добавлением КЗ с размером частиц 15 нм количество бласттрансформированных лимфоцитов увеличилось на 8%, а с добавлением КЗ с размером частиц 60 нм — на 5% по сравнению с использованием ЛПС без добавления КЗ.

Таблица 8.6

Показатели бласттрансформации лимфоцитов при стимуляции различными митогенами (%)

Название препарата	Использование ФГА в качестве митогена	Использование ЛПС в качестве митогена
КЗ-15	$70,3 \pm 0,4$	$74,6 \pm 0,4$
КЗ-60	$80 \pm 0,4$	$71,6 \pm 0,4$
Контроль с митогеном	$59,3 \pm 0,4$	$66,6 \pm 0,4$
Контроль без митогена	$12,6 \pm 0,4$	$14,3 \pm 0,4$

Таким образом, складывается впечатление, что частицы КЗ кроме стимулирования фагоцитарной активности, способны активировать и лимфоциты, причем в большей степени Т-клетки.

В этой связи первоочередным, на наш взгляд, является поиск ответа на вопрос: с какими иммунокомпетентными клетками взаимодействует конъюгат КЗ с АГ на начальных этапах иммунизации? Нами были получены перитонеальные макрофаги и лимфоциты периферической крови. Конъюгаты КЗ с гаптеном (ивермектином) инкубировали в течение 3-х часов с суспензиями данных клеток. После этого клетки трижды отмывали холодным физраствором и лизировали 0,1% Tween 80. Количество гаптена в лизате клеток определяли методом высокоэффек-

тивной жидкостной хроматографии. В результате проведенного анализа мы определили, что в лизате макрофагов содержится до 45% добавленного к клеткам гаптена, в то время как в лизате лимфоцитов — только около 5%. Таким образом, с большой долей вероятности можно заключить, что конъюгаты АГ с КЗ на первых этапах иммунизации включаются в цитоплазму макрофагов.

Этот результат был подтвержден иммуноцитохимическим анализом с использованием флуоресцентной микроскопии. Конъюгат ивермектина с коллоидным золотом инкубировали с суспензией перитонеальных макрофагов. После чего выявляли накопившийся в них гаптен при помощи полученных нами фаговых миниантител на ивермектин, меченных ФИТЦ (фаговый дисплей антител овцы — W.J. Harris, Aberdeen, UK). Иммуноцитохимический анализ продемонстрировал проникновение конъюгата гаптена с коллоидным золотом в цитоплазму макрофагов (рис. 8.6).

Следующий эксперимент был осуществлен совместно с сотрудницей Филадельфийского университета (США) М.В. Сумарока. Схема эксперимента была такова: один из синтетических пептидов ВИЧ и конъюгат этого пептида с КЗ в двукратных разведениях добавляли к В-клеткам (мишеням), которые были рестриктированы по этому пептиду. Затем добавляли цитотоксические Т-клетки. Специфический пептид должен вызывать пролиферацию этих клеток. В результате экспериментов было обнаружено, что пептид, “сидящий” на золоте, усиливал пролиферацию в 10 раз (!) по сравнению с нативным пептидом. Таким образом, получено еще одно, на этот раз практически прямое доказательство влияния частиц КЗ на функционирование иммунокомпетентных клеток. Данный факт показывает принципиальную возможность целенаправленно активировать Т-клетки (например, АГ микобактерий туберкулеза, ВИЧ и др.), с последующей активацией ими макрофагов и уничтожением возбудителя.

Таким образом, в настоящем разделе приведены варианты получения АТ *in vivo* к полноценным АГ и гаптенам различной природы с использованием в качестве носителя частиц КЗ.

Кроме того, получение АТ на конъюгаты БСА, актина и *c-тус* пептида с КЗ без использования ПАФ может свидетельствовать о наличии адьювантных свойств у самого КЗ, что, безусловно, перспективно, например, в работах по созданию нового поколения вакцин. Показано, что КЗ, использованное в качестве носителя АГ, активирует фагоцитарную активность макрофагов и влияет на функционирование лимфоцитов, что, возможно, и определяет его иммуномодулирующий эффект. Наиболее интересным аспектом проявления гаптенами иммуногенных свойств при иммобилизации их на коллоидном золоте является то, что частицы КЗ выступают и в роли адьюванта, и в роли носителя, т.е. каким-то образом представляют гаптен Т-клеткам [787]. С позиций современной иммунологии пока трудно объяснить это явление.

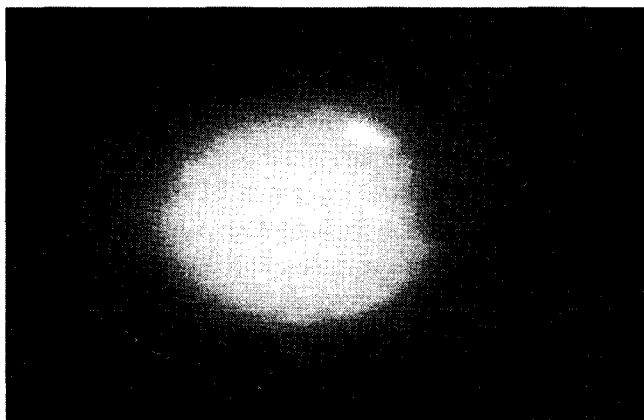


Рис. 8.6. Перитонеальная клетка, культивированная в присутствии ивермектина, адсорбированного на коллоидном золоте

Действительно, в качестве АГ, прикрепляемых к частицам КЗ, в нашей работе использованы вещества различной природы, отличающиеся как по молекулярной массе (42000 Да у актина и ~ 700 –1000 Да у использованных нами антибиотиков и пептидов), по химической природе (полипептиды, полигетероциклические соединения), так и по физико-химическим свойствам.

Напомним, что прикрепление используемых нами молекул к твердым поверхностям происходит вследствие, так называемых, слабых взаимодействий: ван-дер-ваальсовых, кулоновских, гидрофобных и т.п. Следует отметить, что такое их прикрепление к золотым частицам не всегда сопровождается стабилизирующим действием, препятствующим солевой агрегации золь. В нашем случае было важно, чтобы происходила адсорбция молекул на частицах КЗ. В тех случаях, когда они не оказывали защитного действия на золь золота (левомицетин, гентамицин, пептиды 1 и 2 бактериородопсина и др.), об их взаимодействии с поверхностью частиц судили потому, что при понижении pH раствора от значений, указанных в табл. 8.5, до значений pH около 6 (типичных для исходных стабильных золь) происходила агрегация КЗ даже без добавления соли.

Наличие в структуре биотина диссоциирующих и полярных группировок обеспечивает его достаточно прочное взаимодействие с поверхностью металлических коллоидных частиц. Однако сравнительно небольшой молекулярный вес не позволяет ему полностью стабилизировать металлоколлоиды против солевой агрегации. В то же время, несмотря на значительно большую, чем у биотина молекулярную массу, пептиды бактериородопсина не стабилизируют КЗ. Что неудивительно, поскольку в их составе нет ни одной аминокислоты с основными группами в боковой цепи.

Большой интерес с точки зрения адсорбции на КЗ и защитного действия представляет *c-тус* пептид. В состав этого пептида входят пять остатков с диссоциирующими группами в боковых цепях: лизина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Кроме того, на N-конце пептида имеется цистеиновый остаток (отсутствующий в оригинальной последовательности) с трет-бутильной защитой тиольной группы. Несмотря на меньшую длину последовательности и, соответственно, молекулярный вес, *c-тус* пептид полностью стабилизировал КЗ, в отличие от пептидов 1 и 2 бактериородопсина.

Кроме того, маркеры, полученные конъюгацией с АГ, специфически выявляли гомологичные сыворотки. И только в случае ивермектина и тилмикозина при такой постановке опытов

наблюдались перекрестные реакции. Тем не менее, по нашему мнению, эти результаты свидетельствуют в пользу того, что молекулы с массой ниже 1000 дальтон достаточно прочно прикрепляются к поверхности золотых частиц, чтобы быть представленными иммунокомпетентным клеткам. Как отмечалось выше, данный факт может быть подтвержден методами колебательной спектроскопии [693, 702].

Заметим, что адсорбция биомолекул носит динамический характер и что вещества, имеющие большее сродство к золоту, такие как, например, сывороточные белки крови, могут вытеснять биомолекулы с поверхности золотых частиц. Однако природа адсорбата, по-видимому, не особенно сказывается на адьювантных свойствах КЗ. В случае актина, являющегося хорошим стабилизатором для КЗ и, в то же время, низкоиммуногенным АГ в силу своей эволюционной консервативности, в наших экспериментах показано усиление иммунного ответа при использовании конъюгата актина с КЗ [788, 789].

Чем же обусловлены адьювантные свойства КЗ? В настоящее время у нас нет точного ответа на этот вопрос, но, тем не менее, мы позволим себе привести некоторые общие соображения по этому поводу.

На наш взгляд безусловно справедливы рассуждения, приведенные в работе [741], о предпочтительном макрофагальном ответе на корпускулярные АГ, в отличие от растворимых. Подтверждают этот факт и исследователи, изучающие механизмы действия ДНК-вакцин, использующие для транспортировки генетического материала в клетку золотые частицы [763, 765, 767]. В этих исследованиях показана роль клеток Купфера и Лангерганса в формировании иммунного ответа. Более того, именно частицы КЗ использовались авторами [790, 791] для изучения эндоцитоза у макрофагов. А включенные в лизосомы фагоцитов золотые частицы даже получили собственное название — ауросомы. В статье [792] обсуждается влияние на формирование иммунного ответа при введении АГ, конъюгированного с золотыми наночастицами, дендритных клеток.

Однако эти данные не отвечают на вопрос о дальнейших механизмах презентации АГ Т-хелперам. Поскольку по совре-

менным представлениям [1, 793], презентации АГ Т-клеткам предшествует процессинг, т.е. его расщепление на пептидные фрагменты, затем образование соединения с молекулами главного комплекса гистосовместимости, которые и осуществляют транспорт фрагмента АГ на поверхность антигенпрезентирующей клетки, то остается неясным — каким образом этот процесс может происходить с гаптенем? Также не дает ответ на этот вопрос гипотеза мультивалентного АГ, т.е. АГ, образующегося вследствие высокой локальной концентрации одновалентных АГ на поверхности золотой частицы.

Вместе с тем, давно известно влияние солей золота на иммунную систему [794–798]. На свойстве золота изменять неспецифические иммунные реакции организма основаны способы лечения ряда аутоиммунных заболеваний, в частности, ревматоидного артрита. Наряду с этим, в работах [42, 799] сообщается об успешной терапии ревматоидного артрита коллоидным раствором золота. По данным работы [800] эффект КЗ в этом случае заключается в ингибировании моноцит-индуцированной пролиферации лимфоцитов. В работе [801] обсуждается превращение золота (0) в золото (I) в клетках иммунной системы под воздействием некоторых аминокислот.

В конце 2005 г. вышла статья [802], авторы которой изучали воздействие на клетки иммунной системы золотых наночастиц. При использовании атомно-адсорбционной и сканирующей микроскопии исследователи обнаруживали золотые наночастицы в лизосомах и перинуклеарном пространстве клеток. В результате проведенных исследований они делают вывод о том, что частицы КЗ являются нецитотоксичным, неиммуногенным и биосовместимым материалом для потенциального использования в различных областях наноиммунологии, наномедицины и нанобиотехнологии, что противоречит данным работы [803], посвященной токсикологии золота.

Кроме того, в последнее время появилось много работ (см., например, [44, 804–806]), в которых рассматриваются вопросы использования золотых наночастиц для адресной доставки лекарств. В связи с этим хотелось бы отметить, что, на наш взгляд, к этой проблеме необходимо подходить весьма осторожно, учи-

тая возможность выработки в организме животного и человека АГ на вводимое лекарственное вещество, адсорбированное на частицах КЗ.

В заключении заметим, что, возможно, настало время говорить не только о биохимии, но и о **биофизике** иммунного ответа. И что именно уникальные биофизические свойства частиц металлов, в том числе, сильный поверхностный заряд и электростатическое поле частицы, определенным образом влияющие на заряд, ориентацию и поляризацию сорбированных на частицах молекул АГ, оказывают существенное влияние на процесс иммунного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди обширного арсенала средств иммунохимического и иммуноцитохимического анализа особое внимание в представленных выше главах уделено биоспецифическим маркерам — конъюгатам коллоидного золота. Мы попытались расширить его методологическую базу, учитывая относительную простоту получения и эффективность данных биореагентов, высокую чувствительность и специфичность, универсальность способов применения маркеров этого типа в разнообразных биологических исследованиях.

Нашей целью была систематизация обширного литературного материала, результатов собственных теоретических и экспериментальных исследований по: управляемому синтезу металлических наночастиц различных размеров (в диапазоне 3–100 нм) и форм (сферических и стержневых), функционализации их биоспецифическими макромолекулами (иммуноглобулинами, лектинами, ферментами, пептидами, олигонуклеотидами и др.), изучению оптических свойств коллоидно-золотых маркеров в процессе взаимодействия с молекулами-мишенями методами спектроскопии поглощения и рассеяния, динамического светорассеяния, электронной и световой микроскопии. На этом основании можно сформулировать общий вывод: металлические наночастицы с плазмонным резонансом являются эффективным преобразователем межмолекулярных взаимодействий в оптически регистрируемый сигнал. Учитывая соизмеримость меток и зондов, а также незначительное влияние наночастиц благородных металлов на биохимическую активность адсорбированных макромолекул, можно заключить, что биоспецифические маркеры — конъюгаты коллоидного золота весьма перспективны в создании наносенсорных устройств и диагностических си-

стем, позволяющих изучать биохимические процессы на уровнях вплоть до субклеточного и молекулярного (к тому же, в реальном времени).

Завершая изложение представленных в данной книге результатов, хотелось бы отметить, что на рубеже 20-го и 21-го веков мы явились свидетелями формирования и развития новой междисциплинарной области знаний — нанонауки. Ее становление, по-видимому, не следует связывать только с проникновением в характерную область размеров исследуемых объектов. Фактически в нанонауке тесно переплетаются современные представления химии, физики и биологии, направленные на создание новых фундаментальных знаний. На многих объектах показано, что переход от макро- к наноразмерам приводит к появлению качественных изменений физико-химических свойств различных соединений и получаемых на их основе наносистем [102,103,807]. Хочется надеяться, что обобщенный в данной монографии материал представляет интерес для фундаментальной нанонауки и найдет практическое применение в нанотехнологических разработках.

БЛАГОДАРНОСТИ

Считаем приятным долгом выразить глубокую признательность директору ИБФРМ РАН заслуженному деятелю науки РФ профессору д.б.н. Владимиру Владимировичу Игнатову за помощь и полезные советы при подготовке данной книги к публикации.

Мы хотим выразить свою искреннюю благодарность сотрудникам ЛФХКС и ЛБНС ИБФРМ РАН — к.х.н. Шварцбурду Б.И., к.м.н. Сумарока М.В., д.б.н. Матора Л.Ю., Зайцевой И.С., к.в.н. Староверову С.А., к.ф.-м.н. Мельникову А.Г., к.ф.-м.н. Хлебцову Б.Н., сотрудникам других лабораторий ИБФРМ д.б.н. Соколову О.И., д.х.н. Камневу А.А., д.б.н. Игнатову О.В., к.б.н. Селиванову Н.Ю., д.б.н. Чумакову М.И. и всем сотрудникам группы научно-технической информации во главе с Гоголевой Ю.В. за содействие и поддержку при выполнении и оформлении данной работы.

Хотим поблагодарить сотрудников ИБХ РАН д.х.н. профессора Несмеянова В.А., к.х.н. Ламана А.Г. и к.б.н. Шепеляков-

скую А.О. за полезное и содержательное обсуждение и помощь при выполнении отраженных в данной книге иммунологических работ. Мы глубоко признательны сотрудникам химического факультета Афинского аграрного университета профессору Полиссиу М. и доктору Тарантилису П. за помощь в проведении спектроскопических исследований.

Мы выражаем искреннюю признательность и благодарность нашим семьям, родным и друзьям за помощь и человеческую поддержку при проведении исследований и написании этой книги.

Авторы благодарны Российскому фонду фундаментальных исследований (гранты №№ 96-03-32504, 98-03-32664, 01-03-33130, 01-04-48736, 04-04-48601, 04-04-48224, 05-02-16776, 07-04-00301 и 07-04-00302) за финансовую поддержку наших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.
2. Новые методы иммуноанализа / Под ред. У.П. Коллинза. М.: Мир, 1991. 280 с.
3. *Faulk W., Taylor G.* An immunocolloid method for the electron microscope // *Immunochemistry*. 1971. Vol. 8. P. 1081–1083.
4. *Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J.* A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials // *Nature*. 1996. Vol. 382. P. 607–609.
5. *Alivisatos A.P., Johnsson K.P., Peng X. et al.* Organization of nanocrystal molecules using DNA // *Ibid.* P. 609–611.
6. *Mie G.* Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen // *Ann. Phys.* 1908. Bd. 25. S. 377–445.
7. *Ролдугин В.И.* Квантоворазмерные металлические коллоидные системы // *Успехи химии*. 2000. Т. 69. С. 899–923.
8. *Cortie M.* The weird world of nanoscale gold // *Gold Bull.* 2004. Vol. 37. P. 12–19.
9. *Каду Ж.* Алхимики и золото. Киев: София, 1995. 320 с.
10. *Antonii F.* Panacea Aurea-Auro Potabile. Hamburg: Ex Bibliopolio Frobeniano, 1618. 250 p.
11. *Ochsner E.H.* The use of colloidal gold in inoperable cancer // *Inter. J. Med. Surg.* 1927. V. 40. P. 100–104.
12. *Faraday M.* Experimental relations of gold (and others metals) to light // *Philos. Trans. Roy. Soc. London*. 1857. V. 147. P. 145–181.
13. *Zsigmondy R.* Ueber wassrige Lösungen metallischen Goldes // *Ann. Chem.* 1898. Bd. 301. S. 29–54.
14. *Жигмонди Р.* Коллоидная химия. Харьков; Киев: НКСнаб УССР, 1933. 256 с.
15. *Сведберг Т.* Образование коллоидов. Л.: Науч. хим.-техн. изд-во, 1927. 111 с.

16. *De Brouckere L., Casimir J.* Preparation d'hydrosols d'or homeodisperses tres stables // Bull. Soc. chim. Belg. 1948. Vol. 57. P. 517–524.
17. *Fabrikanos A., Athanassiou S., Lieser K.H.* Darstellung stabiler Hydrosole von Gold und Silber durch Reduktion mit Athylendiamintetraessigsäure // Ztschr. Naturforsch. 1963. Bd. 18. S. 612–617.
18. *Beigent C.L., Muller G.* A colloidal gold prepared with ultrasonics // Experimentia. 1980. Vol. 36. P. 472–473.
19. *Turkevich J.* Colloidal gold // Gold Bull. 1985. Vol. 18. P. 86–91, 125–131.
20. *Hainfeld J.F.* A small gold-conjugated antibody label: Improved resolution for electron microscopy // Science. 1987. Vol. 236. P. 450–453.
21. *Turkevich J., Garton G., Stevenson P.C.* The color of colloidal gold // J. Colloid Sci. 1954. Vol. 9. suppl. 1. P. 26–35.
22. *Борен К., Хафмен Д.* Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М.: Мир, 1986. 660 с.
23. *Kreibig U., Vollmer M.* Optical properties of metal clusters. Heidelberg: Springer, 1995. 532 p.
24. *Mishchenko M.I., Travis L.D., Lacis A.A.* Scattering, absorption, and emission of light by small particles. Cambridge: Univ. press, 2002. 462 p.
25. *Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A. et al.* Universal reaction-limited colloid aggregation // Phys. Rev. A. 1990. V. 41. P. 2005–2020.
26. *Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A. et al.* Universal diffusion-limited colloid aggregation // J. Phys. B: Condens. Mater. 1990. Vol. 2. P. 3093–3113.
27. *Кройт Г.Р.* Наука о коллоидах. Т. 1. Необратимые системы. М.: Изд-во иностр. лит. 1955. 540 с.
28. *Heller W., Pugh T.L.* “Steric” stabilization of colloidal solutions by adsorption of flexible macromolecules // J. Polym. Sci. 1960. Vol. 48. P. 203–217.
29. *Thiele H., Hoppe K., Moll G.* Über das kolloide Gold // Kolloid-Z. Z. Polymere. 1962. Bd. 185. S. 45–52.
30. *Баран А.А.* Полимерсодержащие дисперсные системы. Киев: Наук. думка, 1986. 204 с.
31. *Chow M.K., Zukoski C.F.* Gold sols formation mechanisms: Role of colloidal stability // J. Colloid Interface Sci. 1994. Vol. 165. P. 97–109.
32. *Паддефет Р.* Химия золота. М.: Мир, 1982. 259 с.
33. *Бусев А.И., Иванов В.М.* Аналитическая химия золота. М.: Наука, 1973. 264 с.

34. *Маракушев С.А.* Геомикробиология и биохимия золота. М.: Наука, 1991. 111 с.
35. *Ware M.J.* Photographic printing in colloidal gold // *J. Photogr. Sci.* 1994. Vol. 42. P. 157–161.
36. *Liu S., Leech D., Ju H.* Application of colloidal gold in protein immobilization, electron transfer, and biosensing // *Anal. Lett.* 2003. Vol. 36. P. 1–19.
37. *Reddy V.R.* Gold nanoparticles: Synthesis and Applications // *Synlett.* 2006. № 11. P. 1791–1792.
38. *Bond G.C., Louis C., Thompson D.T.* Catalysis by gold. L.: Imperial College press, 2006. 350 p.
39. *Грузина Т.Г., Чеховская Т.П., Вембер В.В., Ульберг З.Р.* Влияние коллоидного золота на физиолого-биохимические процессы в *Escherichia coli* 1257 // *Укр. биохим. журн.* 2003. Т. 75. С. 95–98.
40. *Green F.* The colloidal gold reaction of the cerebrospinal fluid. B.: Medizin Fritz-Dieter S?hn, 1925. 11 p.
41. *Maclagan N.F.* The serum colloidal gold reaction as a liver function test // *Brit. J. Exp. Pathol.* 1944. Vol. 25. P. 15–20.
42. *Abraham G.E., Himmel P.B.* Management of rheumatoid arthritis: Rationale for the use of colloidal metallic gold // *J. Nutr. Med.* 1997. Vol. 7. P. 295–305.
43. *Rogoff E.E., Romano R., Hahn E.W.* The prevention of Ehrlich ascites tumor using intraperitoneal colloidal 198Au // *Radiology.* 1975. Vol. 114. P. 225–226.
44. *Paciotti G.F., Myer L., Weinreich D.et al.* Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery // *Drug Deliv.* 2004. Vol. 11. P. 169–183.
45. *Pitsillides C.M., Joe E.K., Wei X. et al.* Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84. P. 4023–4032.
46. *Zharov V.P., Letfullin R.R., Galitovskay E.* Microbubbles-overlapping mode for laser killing of cancer cells with absorbing nanoparticle clusters // *J. Phys. D.* 2005. Vol. 38. P. 1–11.
47. *Pissuwan D., Valenzuela S.M., Cortie M.B.* Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles // *Trends Biotechnol.* 2006. Vol. 24. P. 62–67.
48. *El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A.* Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nano-

- particles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer // *Nano Lett.* 2005. Vol. 5. P. 829–834.
49. *Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A.* Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods // *J. Amer. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. P. 2115–2120.
50. *Loo C., Lin A., Hirsch L. et al.* Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer // *Technol. Cancer Res. Treatment.* 2004. Vol. 3. P. 33–40.
51. *Mukherjee P., Bhattacharya R., Wang P. et al.* Antiangiogenic properties of gold nanoparticles // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 3530–3534.
52. *Feldherr C.M., Marshall J.M.* The use of colloidal gold for studies of intracellular exchanged in the ameba *Chaos chaos* // *J. Cell Biol.* 1962. Vol. 12. P. 640–645.
53. *Andreu E.J., de Llano J.J.M., Moreno I., Knecht E.* A rapid procedure suitable to assess quantitatively the endocytosis of colloidal gold and its conjugates in cultured cells // *J. Histochem. Cytochem.* 1998. Vol. 46. P. 1199–1202.
54. *Зеленин А.В.* Генная терапия на границе третьего тысячелетия // *Вест. РАН.* 2001. Т. 71. С. 387–395.
55. *Vyas S.P., Sihorkar V.* Endogenous carriers and ligands in non-immunogenic site-specific drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000. Vol. 43. P. 101–164.
56. *Hughes G.A.* Nanostructure-mediated drug delivery // *Nanomedicine.* 2005. Vol. 1. P. 22–30.
57. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature. Phys. Sci.* 1973. Vol. 241. P. 20–22.
58. *Полак Д., Ван Норден С.* Введение в иммуноцитохимию: Современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987. 74 с.
59. *Colloidal gold: Principles, methods, and applications* / Ed. M.A. Hayat. San Diego: Acad. press, 1989. Vol. 1. 538 p.; Vol. 2. 484 p.; 1990. Vol. 3. 421 p.
60. *Techniques in immunocytochemistry* / Ed. G.R. Bullock, P. Petrusz. L.: Acad. press, 1982. Vol. 1. 431 p.; 1983. Vol. 2. 306 p.; 1985. Vol. 3. 256 p.
61. *De Mey J., Moeremans M.* The preparation of colloidal gold probes and their use as marker in electron microscopy // *Advanced techniques*

- in biological electron microscopy / Ed. J.K. Koehler. B.: Springer, 1986. Vol. 3. P. 229–271.
62. *Хомутовский О.А., Луцик М.Д., Передерей О.Ф.* Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. Киев, 1986. 168 с.
63. *Albrecht R.M. Hodges G.M.* Biotechnology and bioapplications of colloidal gold. Chicago: Scanning Microscopy International, 1987. 312 p.
64. *Raška I.* Electron microscopic immunocytochemistry with colloidal gold: Laboratory manual of the practical course by the Institute of Experimental Medicine, Czechoslovak Academy of Sciences in collaboration with the Czechoslovak Biochemical Society of the Czechoslovak Academy of Sciences. Prague, 1988. 110 p.
65. *Verkleij A., Leunissen J.* Immunogold labelling in cell biology. Boca Raton: CRC press, 1989. 376 p.
66. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy / Ed. M. Donbrow. Boca Raton: CRC press, 1992. 360 p.
67. *Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А.* Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. С.-Пб.: Наука, 1994. 400 с.
68. *Beesley J.E.* Colloidal gold: A new perspective for cytochemical marking. B.: Springer, 1998. 64 p.
69. *Javois L.C.* Immunocytochemical methods and protocols. Totowa: Humana press, 1999. 465 p.
70. *Feldheim D.L., Foss C.A.* Metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. N.Y.: Dekker, 2001. 360 p.
71. *Резтер М.Д., Миронов А.А.* Коллоидное золото в электронной микроскопии // Успехи соврем. биологии. 1990. Т. 109. С. 467–480.
72. *Tuckwell J.* The uses of colloidal gold technology in biochemistry // Biochemist. 1991. Vol. 13. P. 6–7.
73. *Horisberger M.* Colloidal gold and its application in cell biology // Intern. Rev. Cytol. 1992. Vol. 136. P. 227–287.
74. *Neagu C., Van der Werf K.O., Putman C.A.J. et al.* Analysis of immunolabeled cells by atomic force microscopy, optical microscopy, and flow cytometry // J. Struct. Biol. 1994. Vol. 112. P. 32–40.
75. *Roth J.* The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry // Histochem. Cell Biol. 1996. Vol. 106. P. 1–8.
76. *Lackie P.M.* Immunogold silver staining for light microscopy // Ibid. P. 9–17.

77. *Hermann R., Walther P., Müller M.* Immunogold labeling in scanning electron microscopy // *Ibid.* 1996. Vol. 106. P. 31–39.
78. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А.* Коллоидное золото в твердофазных методах анализа // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 411–418.
79. *Bendayan M.* A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology // *Biotechnol. Histochem.* 2000. Vol. 75. P. 203–242.
80. *Pellegrino T., Kudera S., Liedl T. et al.* On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications // *Small.* 2005. Vol. 1. P. 48–63.
81. *Rosi N.L., Mirkin C.A.* Nanostructures in biodiagnostics // *Chem. Rev.* 2005. Vol. 105. P. 1547–1562.
82. *Sonvico F., Dubernet C., Colombo P., Couvreur P.* Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics // *Curr. Pharm. Des.* 2005. Vol. 11. P. 2095–2105.
83. *Edwards P., Wilson T.* Choose your labels // *Lab. Practice.* 1987. Vol. 36. P. 13–17.
84. *Bio-Rad Labs Bull.* 1987 № 1310. Western blotting detection systems: How do you choose? 1987. P. 3.
85. *Weiser H.B.* Inorganic colloid chemistry. N.Y.: Wiley, 1933. 389 p.
86. *Jürgens L., Nichtl A., Werner U.* Electron density imaging of protein films on gold-particle surfaces with transmission electron microscopy // *Cytometry.* 1999. Vol. 37. P. 87–92.
87. *Böhmer R.M., King N.J.C.* Immuno-gold labeling for flow cytometric analysis // *J. Immunol. Meth.* 1984. Vol. 74. P. 49–57.
88. *Hillyer J.F., Albrecht R.M.* Correlative instrumental neutron activation analysis, light microscopy, transmission electron microscopy, and X-ray microanalysis for qualitative and quantitative detection of colloidal gold spheres in biological specimens // *Microsc. and Microanal.* 1998. Vol. 4. P. 481–490.
89. *Suzuto M., Hirakawa Y., Ohnishi H. et al.* Nano-kinetics of probe-particles in solution visualized by a pin-fiber video scope // *Anal. Sci.* 2003. Vol. 19. P. 43–47.
90. *Holgate C.S., Jackson P., Cowen P.N., Bird C.C.* Immunogold-silver staining: New method for immuno-staining with enhanced sensitivity // *J. Histochem. Cytochem.* 1983. Vol. 31. P. 938–944.
91. *Danscher G., Norgaard J.O.R.* Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue // *Ibid.* P. 1394–1399.

92. *Hainfeld J.F., Powell R.D., Stein J.K. et al.* Gold-based autometallography // Proc. 57-th Annu. Meeting of Microsc. Soc. Amer. / Ed. G.W. Bailey et al. N-Y.: Springer, 1999. P. 486–487.
93. *Ma Z., Sui S.-F.* Naked-eye sensitive detection of immunoglobulin G by enlargement of Au nanoparticles *in vitro* // Angew. Chem. Intern. Ed. 2002. Vol. 41. P. 2176–2179.
94. *Schalkhammer Th.* Metal nano clusters as transducers for bioaffinity interactions // Chem. Monthly. 1998. Vol. 129. P. 1067–1092.
95. *Jönsson U., Fägerstam L., Ivarsson B. et al.* Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology // BioTechniques. 1991. Vol. 11. P. 620–627.
96. *Malmqvist M.* Biospecific interaction analysis using biosensor technology // Nature. 1993. Vol. 361. P. 186–187.
97. *Huang W., Huang Y.* Preparation and spectroscopic characterization of hydrophobic metallic nanoparticles and their LB films // Spectrosc. Spectrom. Anal. 2000. Vol. 20. P. 449–452.
98. *Musick M.D., Keating C.D., Lyon L.A. et al.* Metal films prepared by stepwise assembly // Chem. Mater. 2000. Vol. 12. P. 2869–2881.
99. *Shipway A.N., Katz E., Willner I.* Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications // Chemphyschem. 2000. Vol. 1. P. 18–52.
100. *Taniguchi N.* On the basic concept of nanotechnology // Proc. Intern. Conf. Prod. Eng. Tokyo: Jap. Soc. Prec. Eng. 1974. P. II. P. 18–23.
101. *Фейнман Р.* Внизу полным-полно места: Приглашение в новый мир // Химия и жизнь. 2002. № 12. С. 20–26.
102. Нанотехнология в ближайшем десятилетии / Под ред. М.К. Роко и др. М.: Мир, 2002. 292 с.
103. Nanobiotechnology: Concepts, applications and perspectives / Ed. C.M. Niemeyer, C.A. Mirkin. Weinheim: Wiley, 2004. 491 p.
104. *De Heer W.A.* The physics of simple metal clusters: Experimental aspects and simple models // Rev. Mod. Phys. 1993. Vol. 65. P. 611–676.
105. *Brack M.* The physics of simple metal clusters: Selfconsistent jellium and semiclassical approaches // Ibid. 677–732.
106. *Schmid G., Chi L.F.* Metal clusters and colloids // Adv. Mater. 1998. Vol. 10. P. 515–527.
107. *Иванов В.К.* Электронные свойства металлических кластеров // Сорос. образов. журн. 1999. № 8. С. 97–102.

108. *Шалаев В.М., Штокман М.И.* Оптические свойства фрактальных кластеров: (Восприимчивость, гигантское комбинационное рассеяние, рассеяние на примесях) // *ЖЭТФ*. 1987. Т. 92. С. 509–522.
109. *Маркель В.А., Муратов Л.С., Штокман М.И.* Теория и численное моделирование оптических свойств фракталов // *ЖЭТФ*. 1990. Т. 98. С. 819–837.
110. *Бутенко А.В., Шалаев В.М., Штокман М.И.* Гигантские примесные нелинейности в оптике фрактальных кластеров // *ЖЭТФ*. 1988. Т. 94. С. 107–124.
111. *Butenko A.V., Chubakov P.A., Danilova Yu.E.* Nonlinear optics of metal fractal clusters // *Ztschr. Phys. D*. 1990. Bd. 17. S. 283–289.
112. *Templeton A.C., Pietron J.J., Murray R.W., Mulvaney P.* Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters // *J. Phys. Chem. B*. 2000. Vol. 104. P. 564–570.
113. *Penn S.G., He L., Natan M.J.* Nanoparticles for bioanalysis // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. Vol. 7. P. 609–615.
114. *Schuk P.* Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997. Vol. 26. P. 541–566.
115. *Lyon L.A., Musick M.D., Natan M.J.* Colloidal Au-enhanced surface-plasmon resonance immunosensing // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 5177–5183.
116. *Martin C.R., Mitchell D.T.* Nanomaterials in analytical chemistry // *Ibid.* P. 322A–327A.
117. *Homola J., Yee S.S., Gauglitz G.* Surface plasmon resonance sensors: Review // *Sensors and Actuators B*. 1999. Vol. 54. P. 3–15.
118. *Mullett W.M., Lai E.P.C., Yeung J.M.* Surface plasmon resonance-based immunoassays // *Methods*. 2000. Vol. 22. P. 77–91.
119. *Schneider B.H., Dickinson E.L., Vach M.D. et al.* Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum // *Biosens. Bioelectron.* 2000. Vol. 15. P. 13–22.
120. *Rich R.L., Myszka D.G.* Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000. Vol. 11. P. 54–61.
121. *Niemeyer C.M.* Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2001. Vol. 40. P. 4128–4158.
122. *Oldenburg S.J., Genick C.C., Clark K.A., Schultz D.A.* Base pair mismatch recognition using plasmon resonant particle labels // *Anal.*

Biochem. 2002. Vol. 309. P. 109–116.

123. *Schultz D.A.* Plasmon resonant particles for biological detection // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. Vol. 14. P. 13–22.

124. *Härmä H.* Particle technologies in diagnostics. Helsinki: Tekes, 2002. 30 p.

125. *Frederix F., Friedt J.-M., Choi K.-H.* et al. Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. P. 6894–6900.

126. *Jain K.K.* Nanodiagnostics: Application of nanotechnology in molecular diagnostics // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2003. Vol. 3. P. 153–161.

127. *Parak W.J., Gerion D., Pellegrino T.* et al. Biological applications of colloidal nanocrystals // *Nanotechnology.* 2003. Vol. 14. P. R15–R27.

128. *Riboh J.C., Haes A.J., McFarland A.D.* et al. A nanoscale optical biosensor: Real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion // *J. Phys. Chem. B.* 2003. Vol. 107. P. 1772–1780.

129. *Grabar K.C., Freeman R.G., Hommer M.B., Natan M.J.* Preparation and characterization of Au colloid monolayers // *Anal. Chem.* 1995. Vol. 67. P. 735–743.

130. *Ulman A.* Formation and structure of self-assembled monolayers // *Chem. Rev.* 1996. Vol. 96. P. 1533–1554.

131. *Nath N., Chilkoti A.* A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74. P. 504–509.

132. *Prasad B.L.V., Stoeva S.I., Sorensen C.M., Klabunde K.J.* Digestive-ripening agents for gold nanoparticles: Alternatives to thiols // *Chem. Mater.* 2003. Vol. 15. P. 935–943.

133. *Haynes C.L., Van Duyne R.P.* Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105. P. 5599–5611.

134. *Adamczyk M., Johnson D.D., Mattingly P.G.* et al. Immunoassay reagents for thyroid testing. 3. Determination of the solution binding affinities of a T4 monoclonal antibody Fab fragment for a library of thyroxine analogs using surface plasmon resonance // *Bioconjugate Chem.* 1998. Vol. 9. P. 23–32.

135. *Adamczyk M., Moore J.A., Yu Z.* Application of surface plasmon resonance toward studies of low-molecular weight antigen-antibody binding interactions // *Methods.* 2000. Vol. 20. P. 319–328.

136. *Seo K.H., Brackett R.E., Hartman N.F., Campbell D.P.* Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella typhimurium* // *J. Food Protect.* 1999. Vol. 62. P. 431–437.
137. *Bao P., Frutos A.G., Greef Ch. et al* High-sensitivity detection of DNA hybridization on microarrays using resonance light scattering // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74. P. 1792–1797.
138. *Raschke G., Kowarik S., Franzl T. et al* Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3. P. 935–942.
139. *McFarland A.D., Van Duyne R.P.* Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity // *Ibid.* 2003. Vol. 3. P. 1057–1062.
140. *Csáki A., Maubach G., Born D. et al.* DNA-based molecular nanotechnology // *Single Mol.* 2002. Vol. 3. P. 275–280.
141. *Feldheim D.L., Keating C.D.* Self-assembly of single electron transistors and related devices // *Chem. Soc. Rev.* 1998. Vol. 27. P. 1–12.
142. *Bozhevolnyi S.I.* Near-field optics of nanostructured surfaces // *Optics of nanostructured materials* / Ed. V.A. Markel, Th.F. George. N.Y.: Wiley, 2000. P. 73–142.
143. *Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I. et al.* Surface-enhanced Raman scattering and biophysics // *J. Phys. B: Condens. Matter.* 2002. Vol. 14. P. R597–R624.
144. *Doering W.E., Nie S.* Single-molecule and single-nanoparticle SERS: Examining the roles of surface active sites and chemical enhancement // *J. Phys. Chem. B.* 2002. Vol. 106. P. 311–317.
145. *Rothenhäusler B., Knoll W.* Surface-plasmon microscopy // *Nature.* 1988. Vol. 332. P. 615–617.
146. *Brockman J.M., Nelson B.P., Corn R.M.* Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2000. Vol. 51. P. 41–63.
147. *Belloni J.* Metal nanocolloids // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 1. P. 184–196.
148. *Yguerabide J., Yguerabide E.* Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. I. Theory // *Anal. Biochem.* 1998. Vol. 262. P. 137–156.
149. *Ролдугин В.И.* Самоорганизация наночастиц на межфазных поверхностях // *Успехи химии.* 2004. Т. 73. С. 123–156.

150. *Schatz G.C.* Electrodynamics of nonspherical noble metal nanoparticles and nanoparticle aggregates // *Theochem.* 2001. Vol. 573. P. 73–80.
151. *Xu H., Käll M.* Modeling the optical response of nanoparticle-based surface plasmon resonance sensors // *Sensors and Actuators B.* 2000. Vol. 287. P. 244–249.
152. *Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A., Dykman L.A.* et al. Optical properties of colloidal-gold bioconjugates // *Appl. Nonlinear Dynamics.* 2002. Vol. 10. P. 172–187.
153. *Hutter E., Fendler J.H.* Exploitation of localized surface plasmon resonance // *Adv. Mater.* 2004. Vol. 16. P. 1685–1706.
154. *Stuart D.A., Haes A.J., Yonzon C.R.* et al. Biological applications of localised surface plasmonic phenomena // *IEE Proc. Nanobiotechnol.* 2005. Vol. 152. P. 13–32.
155. *Katz E., Willner I.* Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2004. Vol. 43. P. 6042–6108.
156. *Акципетров О.А.* Гигантские нелинейно-оптические явления на поверхности металлов // *Сорос. образов. журн.* 2001. Т. 7. С. 109–116.
157. *Pal T.* Nucleophile-induced dissolution of gold and silver in micelle // *Res. Commun. Curr. Sci.* 2002. Vol. 83. P. 627–628.
158. *Schmid G., Corain B.* Nanoparticulated gold: Syntheses, structures, electronics, and reactivities // *Europ. J. Inorg. Chem.* 2002. Vol. 2003. P. 3081–3098.
159. *Pyykkö P.* Theoretical chemistry of gold // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2004. Vol. 43. P. 4412–4456.
160. *Schmidbaur H., Cronje S., Djordjevic B., Schuster O.* Understanding gold chemistry through relativity // *Chem. Phys.* 2005. Vol. 311. P. 151–161.
161. *Гринберг А.А.* Введение в химию комплексных соединений. М.; Л.: Химия, 1966. 632 с.
162. *Goia D.V., Matijević E.* Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold // *Colloids Surface. A.* 1999. Vol. 146. P. 139–152.
163. *Teranishi T.* Metallic colloids // *Encyclopedia of surface and colloid science* / Ed. A. Hubbard. N.Y.: Dekker, 2002. P. 3314–3327.
164. *Daniel M.C., Astruc D.* Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology // *Chem. Rev.* 2004. Vol. 104. P. 293–346.

165. *Roth J.* The colloidal gold marker systems for light and electron microscopic cytochemistry // *Techniques in immunocytochemistry* / Ed. G.R. Bullock, P. Petrusz. L.: Acad. press, 1983. Vol. 2. P. 217–284.
166. *Handley D.A.* Methods for synthesis of colloidal gold // *Colloidal gold: Principles, methods and applications* / Ed. M.A. Hayat. San Diego: Acad. press, 1989. Vol. 1. P. 13–32.
167. *Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J.* A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss. Faraday Soc.* 1951. Vol. 11. P. 55–75.
168. *Stathis E.C., Fabricanos A.* Preparation of colloidal gold // *Chem. Industr. (London)*. 1958. Vol. 27. P. 860–861.
169. *Tschopp J., Podack E.R., Muller-Eberhard H.J.* Ultrastructure of the membrane attack complex of complement: Detection of the tetramolecular C9-polymerizing complex C5b-8 // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. P. 7474–7478.
170. *Birrel G.B., Hedberg K.K.* Immunogold labeling with small gold particles: Silver enhancement provides increased detectability at low magnifications // *J. Electron. Microsc. Technol.* 1987. Vol. 5. P. 219–220.
171. *Di Scipio R.G.* Preparation of colloidal gold particles of various sizes using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 236. P. 168–170.
172. *Mühlpfordt H.* The preparation of colloidal gold particles using tannic acid as an additional reducing agent // *Experientia*. 1982. Vol. 38. P. 1127–1128.
173. *Slot J.W., Geuze H.J.* A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry // *Europ. J. Cell Biol.* 1985. Vol. 38. P. 87–93.
174. *Baschong W., Lucocq J.M., Roth J.* “Thiocyanate gold”: Small (2–3 nm) colloidal gold for affinity cytochemical labeling in electron microscopy // *Histochemistry*. 1985. Vol. 83. P. 409–411.
175. *Thomas J.M.* Colloidal metals: Past, present and future // *Pure Appl. Chem.* 1988. Vol. 60. P. 1517–1518.
176. *Brown K.R., Natan M.J.* Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces // *Langmuir*. 1998. Vol. 14. P. 726–728.
177. *Brown K.R., Walter D.G., Natan M.J.* Seeding of colloidal Au nanoparticles solutions. 2. Improved control of particle size and shape // *Chem. Mater.* 2000. Vol. 12. P. 306–313.

178. *Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J.* Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles // *Langmuir*. 2001. Vol. 17. P. 6782-6786.
179. *Wilcoxon J.P., Provencio P.P.* Heterogeneous growth of metal clusters from solutions of seed nanoparticles // *J. Amer. Chem. Soc.* 2004. Vol. 126. P. 6402-6408.
180. *Hirai H., Aizawa H.* Preparation of stable dispersions of colloidal gold in hexanes by phase transfer // *J. Colloid Interface Sci.* 1993. Vol. 161. P. 471-474.
181. *Green M., O'Brien P.* A simple one phase preparation of organically capped gold nanocrystals // *Chem. Commun.* 2000. № 3. P. 183-184.
182. *Giersig M., Mulvaney P.* Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition // *Langmuir*. 1993. V. 9. P. 3408-3413.
183. *Brust M., Walker D., Bethell D. et al.* Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994. № 7. P. 801-802.
184. *Brust M., Kiely C.J.* Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: A short topical review // *Colloids Surface A*. 2002. Vol. 202. P. 175-186.
185. *Dutta J., Hofmann H.* Self-organization of colloidal nanoparticles // *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology* / Ed. H.S. Nalwa. N.Y.: Amer. sci. publ., 2003. Vol. X. P. 1-23.
186. *Stoeva S., Klabunde K.J., Sorensen C.M., Dragieva I.* Gram-scale synthesis of monodisperse gold colloids by the solvated metal atom dispersion method and digestive ripening and their organization into two- and three-dimensional structures // *J. Amer. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124. P. 2305-2311.
187. *Yeung S.A., Hobson R., Biggs S., Grieser F.* Formation of gold sols using ultrasound // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993. № 4. P. 378-379.
188. *Chen W., Cai W., Zhang L. et al.* Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica // *J. Colloid Interface Sci.* 2001. Vol. 238. P. 291-295.
189. *Mandal M., Kundu S., Ghosh S.K., Pal T.* UV-photoactivation technique for size and shape controlled synthesis and annealing of stable gold nanoparticles in micelle // *Bull. Mater. Sci.* 2002. Vol. 25. P. 509-511.
190. *Niidome Y., Hori A., Sato T., Yamada S.* Enormous size growth of thiol-passivated gold nanoparticles induced by near-IR laser light // *Chem. Lett.* 2000. № 4. P. 310-311.

191. *Gachard P., Remita H., Khatouri J. et al.* Radiation-induced and chemical formation of gold clusters // *New J. Chem.* 1998. Vol. 22. P. 1257–1265.
192. *Mafun? F., Kohno J.-Y., Takeda Y. et al.* Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105. P. 5114–5120.
193. *Mallick K., Witcomb M.J., Scurrall M.S.* Polymer-stabilized colloidal gold: A convenient method for the synthesis of nanoparticles by a UV-irradiation approach // *Appl. Phys. A.* 2005. Vol. 80. P. 395–398.
194. *Ma H., Yin B., Wang S. et al.* Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method // *Chemphyschem.* 2004. Vol. 5. P. 68–75.
195. *Ершов Б.Г.* Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства // *Рос. хим. журн.* 2001. Т. 45. С. 20–30.
196. *McPartlin M., Mason R., Malatesta L.* Novel cluster complexes of gold(0)-gold(1) // *J. Chem. Soc. D. Chem. Commun.* 1969. № 7. P. 334–335.
197. *Bartlett P.A., Bauer B., Singer S.J.* Synthesis of water-soluble undecagold cluster compounds of potential importance in electron microscopic and other studies of biological systems // *J. Amer. Chem. Soc.* 1978. Vol. 100. P. 5085–5089.
198. *Hainfeld J.F., Powell R.D.* New frontiers in gold labeling // *J. Histochem. Cytochem.* 2000. Vol. 48. P. 471–480.
199. *Schaeff T.G., Whetten R.L.* Giant gold glutathione cluster compounds: Intense optical activity in metal-based transitions // *J. Phys. Chem. B.* 2000. Vol. 104. P. 2630–2641.
200. *Ackerson C.J., Jadzinsky P.D., Jensen G.J., Kornberg R.D.* Rigid, specific, and discrete gold nanoparticle/antibody conjugates // *J. Amer. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. P. 2635–2640.
201. *Gardea-Torresdey J.L., Parsons J.G., Gomez E., Peralta-Videa J.* Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants // *Nano Lett.* 2002. Vol. 2. P. 397–401.
202. *Shankar C.S., Ahmad A., Pasricha R., Sastry M.* Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes // *J. Mater. Chem.* 2003. Vol. 13. P. 1822–1826.
203. *Gericke M., Pinches A.* Microbial production of gold nanoparticles // *Gold Bull.* 2006. Vol. 39. P. 22–28.

204. *Anshup A., Venkataraman J.S., Subramaniam C.* et al. Growth of gold nanoparticles in human cells // *Langmuir*. 2005. Vol. 21. P. 11562–11567.
205. *Saraiva S.M., De Oliveira J.F.* Control of particle size in the preparation of colloidal gold // *J. Disp. Sci. Technol.* 2002. Vol. 23. P. 837–844.
206. *Kimling J., Maier M., Okenve B.* et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110. P. 15700–15707.
207. *Mirkin C.A.* Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks // *Inorg. Chem.* 2000. Vol. 39. P. 2258–2272.
208. *Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Мельников А.Г.* Оптические свойства коллоидного золота и его конъюгатов с биоспецифическими макромолекулами // *Коллоид. журн.* 1995. Т. 57. С. 412–423.
209. *Nakamura K., Kawabata T., Mori Ya.* Size distribution analysis of colloidal gold by small angle X-ray scattering and light absorbance // *Powder Technol.* 2003. Vol. 131. P. 120–128.
210. *Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Щеголев С.Ю.* Способ получения биоспецифических маркеров – конъюгатов коллоидного золота Пат. 2013374 РФ, 1994.
211. *Goodman S., Hodges G., Livingston D.* A review of the colloidal gold marker system // *Scanning Electron. Microsc.* 1980. Vol. 2. P. 133–154.
212. *Nowicki W.* Kinetic behaviour of the system composed of nanosized gold particles and very-high-molecular-weight polyacrylamide // *Colloids Surface A*. 2001. Vol. 194. P. 159–173.
213. *Doron A., Joselevich E., Schlittner A., Willner I.* AFM characterization of the structure of Au-colloid monolayers and their chemical etching // *Thin Solid Films*. 1999. Vol. 340. P. 183–188.
214. *Scaffardi L.B., Tocho J.O.* Size dependence of refractive index of gold nanoparticles // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17. P. 1309–1315.
215. *Chithrani B.D., Ghazani A.A., Chan W.C.W.* Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6. P. 662–668.
216. *Andreescu D., Sau T.K., Goia D.V.* Stabilizer-free nanosized gold sols // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 298. P. 742–751.
217. *Horisberger M.* The gold method as applied to lectin. Cytochemistry in transmission and scanning electron microscopy // *Techniques in Immu-*

- nocytochemistry / Ed. G.R. Bullock, P. Petrusz. L.: Acad. press, 1985. Vol. 3. P. 155–178.
218. Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Определение среднего размера и оценка полидисперсности наночастиц золота по спектрам поглощения и рассеяния света // Оптика и спектроскопия. 2004. Т. 96. С. 139–147.
219. Berne B.J., Pecora R. Dynamic light scattering with application to chemistry, biology, and physics. N.Y: Dover, 2002. 376 p.
220. Клубин В.В., Круглова Л.А., Сахарова Н.А., Таллиер Ю.А. Измерение дисперсного состава латексов с помощью метода динамического рассеяния света // Коллоид. журн. 1990. Т. 52. С. 470–477.
221. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н. и др. Многослойная модель биоконъюгатов золотых наночастиц: исследование адсорбции желатина и иммуноглобулина человека с использованием спектров статического рассеяния и поглощения света и метода динамического светорассеяния // Там же. 2003. Т. 65. С. 679–693.
222. Murillo L.E., Viera O., Vicuña E. et al. Growth kinetics of gold nanoparticles // Nanotechnology. 2002. Vol. 2. P. 435–438.
223. Helfrich A., Brüchert W., Bettmer J. Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques // J. Anal. Atom. Spectrom. 2006. Vol. 21. P. 431–434.
224. Zhou Y., Itoh H., Uemura T. et al. Preparation of π -conjugated polymer-protected gold nanoparticles in stable colloidal form // Chem. Commun. 2001. № 7. P. 613–614.
225. Sato S., Toda K., Oniki S. Kinetic study on the formation of colloidal gold in the presence of acetylenic glycol nonionic surfactant // J. Colloid Interface Sci. 1999. Vol. 218. P. 504–510.
226. Tan Y., Dai X., Li Y., Zhu D. Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant–potassium bitartrate // J. Mater. Chem. 2003. Vol. 13. P. 1069–1075.
227. Esumi K., Takei N., Yoshimura T. Antioxidant-potentiality of gold–chitosan nanocomposites // Colloid Surface B. 2003. Vol. 32. P. 117–123.
228. Pal A. Preparation of ultrafine colloidal gold particles using a bioactive molecule // J. Nanoparticle Res. 2004. Vol. 6. P. 27–34.
229. Sugimoto T. Preparation of monodispersed colloidal particles // Adv. Colloid Interface Sci. 1987. Vol. 28. P. 65–108.

230. *Longenberger L., Mills G.* Formation of metal particles in aqueous-solutions by reactions of metal-complexes with polymers // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99. P. 475–478.
231. *Teranishi T., Miyake M.* Size control of metal nanoparticles with aid of surface protection by polymer // *Hyomen.* 1997. Vol. 35. P. 439–452.
232. *Hirai H., Nakao Y., Toshima N.* Preparation of colloidal transition metals in polymers by reduction with alcohols or ethers // *J. Macromol. Sci. Chem.* 1979. Vol. 13. P. 727–750.
233. *Spatz J.P., Mössmer S., Möller M.* Mineralization of gold nanoparticles in a block copolymer microemulsion // *Chem. Europ. J.* 1996. Vol. 12 P. 1552–1555.
234. *Liu Q., Liu H., Zhou Q.* Synthesis of nearly monodispersive gold nanoparticles by a sodium diphenylamine sulfonate reduction process // *J. Mater. Sci.* 2006. Vol. 41. P. 3657–3662.
235. *Esumi K., Susuki A., Aihara N. et al.* Preparation of gold colloids with UV irradiation using dendrimers as stabilizer // *Langmuir.* 1998. Vol. 14. P. 3157–3159.
236. *Otsuka H., Akiyama Y., Nagasaki Y., Kataoka K.* Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with α -lactosyl- ω -mercapto-poly(ethylene glycol) // *J. Amer. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123. P. 8226–8230.
237. *Nuss S., Böttcher H., Wurm H., Hallensleben M.L.* Gold nanoparticles with covalently attached polymer chains // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2001. Vol. 40. P. 4016–4018.
238. *Slocik J.M., Stone M.O., Naik R.R.* Synthesis of gold nanoparticles using multifunctional peptides // *Small.* 2005. Vol. 1. P. 1048–1052.
239. *Kunz M.S., Shul K.R., Kellok A.J.* Colloidal gold dispersions in polymeric matrices // *J. Colloid Interface Sci.* 1993. Vol. 156. P. 240–249.
240. *Corbierre M.K., Cameron N.S., Sutton M. et al.* Polymer-stabilized gold nanoparticles and their incorporation into polymer matrices // *J. Amer. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123. P. 10411–10412.
241. *Selvan S.T., Spatz J.P., Klock H.-A., Möller M.* Gold-polypyrrole core-shell particles in diblock copolymer micelles // *Adv. Mater.* 1998. Vol. 10. P. 132–134.
242. *Siiman O., Burshteyn A.* Formation of colloidal metal dispersions using aminodextrans as reductants and protective agents. Pat. 5248772 US, 1993.
243. *Skutelsky E., Roth J.* Cationic colloidal gold – a new probe for the detection of anionic cell surface sites by electron microscopy // *J.*

Histochem. Cytochem. 1986. Vol. 34. P. 693–696.

244. Wang S.T., Yan J.C., Chen L. Formation of gold nanoparticles and self-assembly into dimer and trimer aggregates // Mater. Lett. 2005. Vol. 59. P. 1383–1386.

245. Singh A.V., Bandgar B.M., Kasture M. et al. Synthesis of gold, silver and their alloy nanoparticles using bovine serum albumin as foaming and stabilizing agent // J. Mater. Chem. 2005. Vol. 15. P. 5115–5121.

246. Hoppe C.E., Lazzari M., Pardñas-Blanco I., López-Quintela M.A. One-step synthesis of gold and silver hydrosols using poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) as a reducing agent // Langmuir. 2006. Vol. 22. P. 7027–7034.

247. Дыкман Л.А., Ляхов А.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю. Синтез коллоидного золота с применением высокомолекулярных восстановителей // Коллоид. журн. 1998. Т. 60. С. 757–762.

248. Yu Y.-Y., Chang S.-S., Lee C.-L., Wang C.R.C. Gold nanorods: Electrochemical synthesis and optical properties // J. Phys. Chem. B. 1997. Vol. 101. P. 661–664.

249. Chang S.-S., Shih C.-W., Chen C.-D. et al. The shape transition of gold nanorods // Langmuir. 1999. Vol. 15. P. 701–709.

250. Link S., El-Sayed M.A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals // Annu. Rev. Phys. Chem. 2003. Vol. 54. P. 331–346.

251. Mohamed M.B., Volkov V., Link S., El-Sayed M.A. The ‘lightning’ gold nanorods: Fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal // Chem. Phys. Lett. 2000. Vol. 317. P. 517–523.

252. Хлебцов Н.Г., Трачук Л.А., Мельников А.Г. Влияние размера, формы и структуры металлических наночастиц на зависимость их оптических свойств от показателя преломления дисперсионной среды // Оптика и спектроскопия. 2005. Т. 98. С. 82–89.

253. Miller M.M., Lazarides A.A. Sensitivity of metal nanoparticle surface plasmon resonance to the dielectric environment // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109. P. 21556–21565.

254. Sönnichsen C., Alivisatos A.P. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy // Nano Lett. 2005. Vol. 5. P. 301–304.

255. Dietrich H.R.C., Young I.T., Garini Y. Gold nanoparticles: A novel application of spectral imaging in proteomics – preliminary results // Proc. SPIE. 2005. Vol. 5694. P. 82–89.

256. *Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Alekseeva A.V. et al.* Observation of time-dependent single-particle light scattering from gold nanorods and nanospheres by using unpolarized dark-field microscopy // *Ibid.* 2006. Vol. 1664. P. 1–10.
257. *Chang J.-Y., Wu H., Chen H. et al.* Oriented assembly of Au nanorods using biorecognition system // *Chem. Commun.* 2005. № 8. P. 1092–1094.
258. *Salem A.K., Hung C.F., Kim T.W. et al.* Multi-component nanorods for vaccination applications // *Nanotechnology.* 2005. Vol. 16. P. 484–487.
259. *Liao H., Hafner J.H.* Gold nanorod bioconjugates // *Chem. Mater.* 2005. Vol. 17. P. 4636–4641.
260. *Pan S.L., Chen M., Li H.L.* Aqueous gold sols of rod-shaped particles prepared by the template method // *Colloids Surface A.* 2001. Vol. 180. P. 55–62.
261. *Van der Zande B.M.I., Böhmer M.R., Fokkink L.G.J., Schönenberger C.* Colloidal dispersions of gold rods: Synthesis and optical properties // *Langmuir.* 2000. Vol. 16. P. 451–458.
262. *Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J.* Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods // *J. Phys. Chem.* 2001. Vol. 105. P. 4065–4067.
263. *Nikoobakht B., El-Sayed M.A.* Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method // *Chem. Mater.* 2003. Vol. 15. P. 1957–1962.
264. *Русанов А.И.* Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ. С-Пб.: Химия, 1992. 280 с.
265. *Pérez-Juste J., Pastoriza-Santos I., Liz-Marzán L.M., Mulvaney P.* Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications // *Coord. Chem. Rev.* 2005. Vol. 249. P. 1870–1901.
266. *Murphy C.J., Sau T.K., Gole A.M. et al.* Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109. P. 13857–13870.
267. *Liz-Marzán L.M.* Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles // *Langmuir.* 2006. Vol. 22. P. 32–41.
268. *Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J.* Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rodlike gold nanoparticles using a surfactant tem // *Adv. Mater.* 2001. Vol. 13. P. 1389–1393.
269. *Zweifel D.A., Wei A.* Sulfide-arrested growth of gold nanorods // *Chem. Mater.* 2005. Vol. 17. P. 4256–4261.

270. *Gao J., Bender C.M., Murphy C.J.* Dependence of the gold nanorod aspect ratio on the nature of the directing surfactant in aqueous solution // *Langmuir*. 2003. Vol. 19. P. 9065–9070.
271. *Púrez-Juste J., Liz-Marzán L.M., Carnie S.* et al. Electric-field-directed growth of gold nanorods in aqueous surfactant solutions // *Adv. Func. Mater.* 2004. Vol. 14. P. 571–579.
272. *Wei Z., Zamborini F.P.* Directly monitoring the growth of gold nanoparticle seeds into gold nanorods // *Langmuir*. 2004. Vol. 20. P. 11301–11304.
273. *Jana N.R., Gearheart L., Obare S.O., Murphy C.J.* Anisotropic chemical reactivity of gold spheroids and nanorods // *Ibid.* 2002. Vol. 18. P. 922–927.
274. *Liu M., Guyot-Sionnest P.* Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids // *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109. P. 22192–22200.
275. *Orendorff C.J., Murphy C.J.* Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods // *Ibid.* 2006. Vol. 110. P. 3990–3994.
276. *Link S., El-Sayed M.A.* Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods // *Ibid.* 1999. Vol. 103. P. 8410–8426.
277. *Alekseeva A.V., Bogatyrev V.A., Dykman L.A.* et al. Preparation and optical scattering characterization of Au nanorods and their application to a dot-immunogold assay // *Appl. Opt.* 2005. Vol. 44. P. 6285–6295.
278. *Khlebtsov N.G., Melnikov A.G., Bogatyrev V.A.* et al. Can the light scattering depolarization ratio of small particles be greater than 1/3? // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. P. 13578–13584.
279. *Brioude A., Jiang X.C., Pileni M.P.* Optical properties of gold nanorods: DDA simulations supported by experiments // *Ibid.* 2005. Vol. 109. P. 13138–13142.
280. *Link S., Mohamed M.B., El-Sayed M.A.* Simulation of the optical absorption spectra of a gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant // *Ibid.* 1999. Vol. 103. P. 3073–3077.
281. *Yan B., Yang Y., Wang Y.* Comment on “Simulation of the optical absorption spectra of a gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant” // *Ibid.* 2003. Vol. 107. P. 9159.

282. *Johnson C.J., Dujardin E., Davis S.A. et al.* Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis // *J. Chem. Mater.* 2002. Vol. 12. P. 1765–1770.
283. *Chen H.M., Peng H.-C., Liu R.-S. et al.* Controlling the length and shape of gold nanorods // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109. P. 19553–19555.
284. *Nehl C.L., Liao H., Hafner J.H.* Optical properties of star-shaped gold nanoparticles // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6. P. 683–688.
285. *Alekseeva A.V., Bogatyrev V.A., Trachuk L.A., Khlebtsov N.G.* Synthesis, fractionation and optical characterization of Au-Ag composite nanorods // *Proc. SPIE.* 2005. Vol. 5772. P. 18–32.
286. *Al-Sherbini A.-S.A.-M.* Thermal instability of gold nanorods in micellar solution of water/glycerol mixtures // *Colloids Surface A.* 2004. Vol. 246. P. 61–69.
287. *Khlebtsov N.G., Trachuk L.A., Melnikov A.G.* Plasmon resonances of silver and gold nanorods // *Proc. SPIE.* 2004. Vol. 5475. P. 1–11.
288. *Jiang X.C., Brioude A., Pileni M.P.* Gold nanorods: Limitations on their synthesis and optical properties // *Colloids Surface A.* 2006. Vol. 277. P. 201–206.
289. *Hirsch L.R., Gobin A.M., Lowery A.R. et al.* Metal nanoshells // *Ann. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 34. P. 15–22.
290. *Khlebtsov B.N., Dykman L.A., Bogatyrev V.A. et al.* A solid-phase dot assay using silica/gold nanoshells // *Nanoscale Res. Lett.* 2007. Vol. 2. P. 6–11.
291. *Hu M., Chen J., Li Z.-Y. et al.* Gold nanostructures: Engineering their plasmonic properties for biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* 2006. Vol. 35. P. 1084–1094.
292. *Granqvist C.G., Hunderi O.* Optical properties of ultrafine gold particles // *Phys. Rev. B.* 1977. Vol. 16. P. 3513–3554.
293. *Shalaev V.M., Botet R., Jullien R.* Resonant light scattering by fractal clusters // *Ibid.* 1991. Vol. 44. P. 12216–12226.
294. *Markel V.A., Shalaev V.M., Stechel E.B. et al.* Small-particle composites. I. Linear optical properties // *Ibid.* 1996. Vol. 53. P. 2425–2436.
295. *Плеханов А.И., Плотников Г.Л., Сафонов В.П.* Получение фрактальных кластеров серебра при лазерном испарении мишени и их спектроскопическое исследование // *Оптика и спектроскопия.* 1991. Т. 71. С. 775–780.
296. *Kelly K., Coronado E., Zhao L., Schatz G.* The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment // *J. Phys. Chem. B.* 2003. Vol. 107. P. 668–677.

297. *Mulvaney P.* Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles // *Langmuir*. 1996. Vol. 12. P. 788–800.
298. *Alvarez M.M., Khoury J.T., Schaaff T.G.* et al. Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules // *J. Phys. Chem. B*. 1997. Vol. 101. P. 3706–3712.
299. *Logunov S.L., Ahmadi T.S., El-Sayed M.A.* et al. Electron dynamics of passivated gold nanocrystals probed by subpicosecond transient absorption spectroscopy // *Ibid.* 1997. Vol. 101. P. 3713–3719.
300. *Schaaff T.G., Shafigullen M.N., Khoury J.T.* et al. Isolation of smaller nanocrystal Au molecules: Robust quantum effects in optical spectra // *Ibid.* 1997. Vol. 101. P. 7885–7891.
301. *Zaitoun M.A., Mason W.R., Lin C.T.* Magnetic circular dichroism spectra for colloidal gold nanoparticles in Xerogels at 5.5 K // *Ibid.* 2001. Vol. 105. P. 6780–6784.
302. *Melinger J.S., Kleiman V.D., McMorro D.* et al. Ultrafast dynamics of gold-based nanocomposite materials // *J. Phys. Chem. A*. 2003. Vol. 107. P. 3424–3431.
303. *Van der Hulst H.C.* Light scattering by small particles. N.Y.: Wiley, 1957. 321 p.
304. *Кленин В.И., Щеголев С.Ю., Лаврушин В.И.* Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1977. 736 с.
305. *Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н.* Двухслойная модель биоконъюгатов коллоидного золота и ее применение для оптимизации наносенсоров // *Коллоид. журн.* 2003. Т. 65. С. 552–562.
306. *Templeton A.C., Pietron J.J., Murray R.W., Mulvaney P.* Solvent refractive index and core charge influences on the nanoparticle solutions // *J. Appl. Phys.* 2002. Vol. 92. P. 7486–7490.
307. *Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Melnikov A.G.* Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 180. P. 436–445.
308. *Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Краснов Я.М.* и др. Метод дифференциальной спектроскопии рассеянного света для исследования биоспецифических реакций в системах конъюгатов золотых наночастиц с белками или олигонуклеотидами // *Коллоид. журн.* 2002. Т. 64. С. 745–755.
309. *Taton T.A., Lu C., Mirkin C.A.* Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes // *J. Amer.*

Chem. Soc. 2001. Vol. 123. P. 5164–5165.

310. *Malinsky M.D., Kelly K.L., Schatz G.C., Van Duyne R.P.* Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers // *Ibid.* 2001. Vol. 123. P. 1471–1482.

311. *Underwood S., Mulvaney P.* Effect of the solution refractive index on the color of gold colloids // *Langmuir.* 1994. Vol. 10. P. 3427–3430.

312. *Papavassiliou G.C.* Optical properties of small inorganic and organic metal particles // *Progr. Solid State Chem.* 1979. Vol. 12. P. 185–271.

313. *Link S., El-Sayed M.A.* Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* 1999. Vol. 103. P. 4212–4217.

314. *Itoh T., Asahi T., Masuhara H.* Femtosecond light scattering spectroscopy of single gold nanoparticles // *Appl. Phys. Lett.* 2001. Vol. 79. P. 1667–1669.

315. *Su K.-H., Wei Q.-H., Zhang X. et al.* Interparticle coupling effects on plasmon resonance of nanogold particles // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3. P. 1087–1090.

316. *Rechberger W., Hohenau A., Leitner A. et al.* Optical properties of two interacting gold nanoparticles // *Opt. Commun.* 2003. Vol. 220. P. 137–141.

317. *Swanson N.L., Billard B.D.* Optimization of extinction from surface plasmon resonances of gold nanoparticles // *Nanotechnology.* 2003. Vol. 14. P. 353–357.

318. *Ung T., Liz-Marzán L.M., Mulvaney P.* Gold particles thin films // *Colloids Surface A.* 2002. Vol. 202. P. 119–126.

319. *Hall S.R., Davis S.A., Mann S.* Co-condensation of organosilica hybrid shells on nanoparticle templates: A direct synthetic route to functionalized core-shell colloids // *Langmuir.* 2000. Vol. 16. P. 1454–1456.

320. *Ung T., Giersig M., Dunstan D., Mulvaney P.* Spectroelectrochemistry of colloidal silver // *Ibid.* 1997. Vol. 13. P. 1773–1782.

321. *Ung T., Liz-Marzán L.M., Mulvaney P.* Optical properties of thin films of AuSiO₂ particles // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105. P. 3441–3452.

322. *Klar T., Perner M., Grosse S. et al.* Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles // *Phys. Rev. Lett.* 1998. Vol. 80. P. 4249–4252.

323. *Al-Rawashdeh N.A.F., Foss C.A., Jr.* UV/visible and infrared spectra of polyethylene/nanoscope gold rod composite films: Effects of gold particle size, shape, and orientation // *Nanostruct. Mater.* 1997. Vol. 9. P. 383–386.
324. *Al-Rawashdeh N.A.F., Sandrock M.L., Seugling C.J., Foss C.A., Jr.* Visible region polarization spectroscopic studies of template-synthesized gold nanoparticles oriented in polyethylene // *J. Phys. Chem. B.* 1998. Vol. 102. P. 361–371.
325. *Linden S., Christ A., Kuhl J., Giessen H.* Selective suppression of extinction within the plasmon resonance of gold nanoparticles // *Appl. Phys. B.* 2001. Vol. 73. P. 311–316.
326. *Linden S., Kuhl J., Giessen H.* Controlling the interaction between light and gold nanoparticles: Selective suppression of extinction // *Phys. Rev. Lett.* 2001. Vol. 86. P. 4688–4691.
327. *Ahmadi T.S., Logunov S.L., El-Sayed M.A.* Picosecond dynamics of colloidal gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* 1999. Vol. 100. P. 8059–8056.
328. *Hartland G.V., Hu M., Sader J.E.* Softening of the symmetric breathing mode in gold particles by laser-induced heating // *Ibid.* 2003. Vol. 107. P. 7472–7478.
329. *Fujiwara H., Yanagida S., Kamat P.V.* Visible laser induced fusion and fragmentation of thionicotinamide-capped gold nanoparticles // *Ibid.* 1999. Vol. 103. P. 2589–2591.
330. *Takeuchi Y., Ida T., Kimura K.* Colloidal stability of gold nanoparticles in 2-propanol under laser irradiation // *Ibid.* 1997. Vol. 101. P. 1322–1327.
331. *Sato N., Hasegawa H., Tsujii K., Kimura K.* Photoinduced coagulation of Au nanocolloids // *J. Phys. Chem.* 1994. Vol. 98. P. 2143–2147.
332. *Mafuné F., Kohno J.-Y., Takeda Y., Kondow T.* Dissociation and aggregation of gold nanoparticles under laser irradiation // *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105. P. 9050–9056.
333. *Westcott S.L., Oldenburg S.J., Lee T.R., Halas N.J.* Construction of simple gold nanoparticle aggregates with controlled plasmon-plasmon interactions // *Chem. Phys. Lett.* 1999. Vol. 300. P. 651–655.
334. *Eck D., Helm C.A., Wagner N.J., Vaynberg K.A.* Plasmon resonance measurements of the adsorption and desorption kinetics of a biopolymer onto gold nanocolloids // *Langmuir.* 2001. Vol. 17. P. 957–960.
335. *Chandrasekharan N., Kamat P.V., Hu J., Jones G.* Dye-capped gold nanoclusters: Photoinduced morphological changes in gold/rhodamine 6G

- nanoassemblies // J. Phys. Chem. B. 2000. Vol. 104. P. 11103–11109.
336. *Nath N., Chilkoti A.* Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance // J. Amer. Chem. Soc. 2001. Vol. 123. P. 8197–8202.
337. *Huang S., Minami K., Sakaue H. et al.* Optical spectroscopic studies of the dispersibility of gold nanoparticle solutions // J. Appl. Phys. 2002. Vol. 92. P. 7486–7490.
338. *Thomas K.G., Zajicek J., Kamat P.V.* Surface binding properties of tetraoctylammonium bromide-capped gold nanoparticles // Langmuir. 2002. Vol. 18. P. 3722–3727.
339. *Swami A., Kumar A., Sastry M.* Formation of water-dispersible gold nanoparticles using a technique based on surface-bound interdigitated bilayers // Ibid. 2003. Vol. 19. P. 1168–1172.
340. *Malikova N., Pastoriza-Santos I., Schierhorn M. et al.* Layer-by-layer assembled mixed spherical and planar gold nanoparticles: Control of interparticle interactions // Ibid. 2002. Vol. 18. P. 3694–3697.
341. *Aizpurua J., Hanarp P., Sutherland D.S. et al.* Optical properties of gold nanorings // Phys. Rev. Lett. 2003. Vol. 90. P. 057401-1-057401-4.
342. *Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Мельников А.Г.* Спектральные свойства коллоидного золота // Оптика и спектроскопия. 1996. Т. 80. С. 128–137.
343. *Davis V.A., Schwartz L.* Electromagnetic propagation in close-packed disordered suspensions // Phys. Rev. B. 1985. Vol. 31. P. 5155–5165.
344. *Doyle W.T.* Optical properties of a suspension of metal spheres // Ibid. 1989. Vol. 39. P. 9852–9858.
345. *Ding K.H., Tsang L.* Effective propagation constants in media with densely distributed dielectric particles of multiple sizes and permittivities // Progress in electromagnetic research / Ed. J.A. Kong. N.Y.: Elsevier, 1989. P. 241–295.
346. *Kerker M.* The optics of colloidal silver – something old and something new // J. Colloid Interface Sci. 1985. Vol. 105. P. 297–314.
347. *Doyle W.T.* Absorption of light by colloids in alkali halide crystals // Phys. Rev. 1958. Vol. 111. P. 1067–1072.
348. *Doremus R.Y.* Optical properties of small gold particles // J. Chem. Phys. 1964. Vol. 40. P. 2389–2396.
349. *Caro R.A., Nicolini J.O., Radicella R.* Determination of gold sol concentrations from spectrophotometric data // Intern. J. Appl. Radiat.

Isotop. 1967. Vol. 18. P. 329–331.

350. *Skillman D.C., Berry C.R.* Optical absorption of small silver spheres in water // J. Appl. Phys. 1971. Vol. 42. P. 2818–2822.

351. *Sinzig J., Quinten M.* Scattering and absorption by spherical multilayer particles // Appl. Phys. A. 1994. Vol. 58. P. 157–162.

352. *Золотарев В.М., Морозов В.Н., Смирнова Е.В.* Оптические постоянные природных и технических сред. Л.: Наука, 1984. 216 с.

353. *Otter M.* Optical constants of gold, copper and silver // Ztschr. Phys. 1961. Bd. 161. S. 163–178.

354. *Hagemann H.-J., Gudat W., Kunz C.* Optical constants from the far infrared to the X-ray region: Mg, Al, Cu, Ag, Au, Bi, C, and Al_2O_3 // J. Opt. Soc. Amer. 1975. Vol. 65. P. 742–744.

355. *Canfeld L.R., Hass A., Hunter W.R.* The optical properties of evaporated gold in the vacuum ultraviolet from 300 Å to 2000 Å // J. Phys. 1964. Vol. 25. P. 124.

356. *Schulz L.G.* The optical constants of Ag, Cu, and Al // J. Opt. Soc. Amer. 1954. Vol. 44. P. 357–368.

357. *Irani G.B., Huen T., Wooten F.* Optical properties of Ag and alpha-phase Ag-Al alloys // Ibid. 1971. Vol. 61. P. 128–129.

358. *Куммель Ч.* Введение в физику твердого тела. М.: Мир, 1978. 792 с.

359. *Römer H., Fragstein C.* Bestimmung des Absorptionskoeffizienten und des Brechungsquotienten von kolloidalem Gold // Ztschr. Phys. 1961. Bd. 163. S. 27–43.

360. *Лушников А.А., Максименко В.В.* Квантовая оптика металлической частицы // ЖЭТФ. 1993. Т. 103. С. 1010–1044.

361. *Василенко В.А.* Сплайн-функции: Теория, алгоритмы, программы. Новосибирск: Наука, 1983. 214 с.

362. *Хлебцов Н.Г., Мельников А.Г., Щеголев С.Ю.* Спектротурбидиметрия дисперсных систем с учетом спектральной зависимости показателя преломления // Коллоид. журн. 1991. Т. 53. С. 928–933.

363. *Johnson P.B., Christy R.W.* Optical constants of noble metals // Phys. Rev. B. 1972. Vol. 6. P. 4370–4379.

364. *Хлебцов Н.Г.* Ослабление и рассеяние света хаотически ориентированным ансамблем: Точное решение в Т-матричном подходе // Оптика и спектроскопия. 1991. Т. 71. С. 151–153.

365. *Khlebtsov N.G.* Orientational averaging of light scattering observables in the T-matrix approach // Appl. Opt. 1992. Vol. 31. P. 5359–5365.

366. *Мищенко М.М.* Расчет интегральных характеристик светорассеяния для ансамбля хаотически ориентированных несферических частиц // Кинемат. физика небес. тел. 1990. Т. 6. С. 95–96.
367. *Mishchenko M.I.* Light scattering by randomly oriented axially symmetric particles // J. Opt. Soc. Amer. A. 1991. Vol. 8. P. 871–882.
368. *Jeppesen M.A., Barlow R.B.* Determination of particle size of colloidal gold from absorption spectra // J. Opt. Soc. Amer. 1962. Vol. 52. P. 99–101.
369. *Eversole J.D., Broida H.P.* Size and shape effects in light scattering from small silver, copper, and gold particles // Phys. Rev. B. 1977. Vol. 15. P. 1644–1655.
370. *Jones A.R.* Light scattering for particle characterization // Progr. Energy and Combust. Sci. 1999. Vol. 25. P. 1–53.
371. *Yguerabide J., Yguerabide E.* Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. II. Experimental characterization // Anal. Biochem. 1998. Vol. 262. P. 157–176.
372. *Ландсберг Г.С.* Оптика. М.: Наука, 1976. 928 с.
373. *Liu X., Yuan H., Pang D., Cai R.* Resonance light scattering spectroscopy study of interaction between gold colloid and thiamazole and its analytical application // Spectrochim. acta. A. 2004. Vol. 60. P. 385–389.
374. *Dragnea B., Chen C., Kwak E.-S. et al.* Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for *in vitro* studies on single viruses // J. Amer. Chem. Soc. 2003. Vol. 125. P. 6374–6375.
375. *Kahlau T., Quinten M., Kreibig U.* Extinction and angle-resolved light scattering from aggregated metal clusters // Appl. Phys. A. 1996. Vol. 62. P. 19–27.
376. *Roll D., Malicka J., Gryczynski I. et al.* Metallic colloid wavelength-ratiometric scattering sensors // Anal. Chem. 2003. Vol. 75. P. 3440–3445.
377. *Wang Y.-F., Pang D.-W., Zhang Z.-L. et al.* Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement // J. Med. Virol. 2003. Vol. 70. P. 205–211.
378. *Zhiliang J., Zhongwei F., Tingsheng L. et al.* Resonance scattering spectroscopy of gold nanoparticle // Sci. China. 2001. Vol. 44. P. 175–181.
379. *Zhu C.-Q., Li D.-H., Zhu Q.-Z. et al.* Determination of proteins at nanogram levels by their quenching effect on large particle scattering of colloidal silver chloride // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. Vol. 366. P. 863–868.

380. *Bogatyrev V.A., Medvedev B.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G.* Light scattering spectra of colloidal gold aggregates: Experimental measurements and theoretical simulations // *Proc. SPIE*. 2001. Vol. 4241. P. 42–48.
381. *Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A., Melnikov A.G. et al.* Differential light-scattering spectroscopy: A new approach to studying of colloidal gold nanosensors // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2004. Vol. 89. P. 133–142.
382. *Башурова В.С., Камха М.А., Пусеп А.Ю., Федоренко С.Г.* Экспериментальные особенности исследования функции распределения дисперсной фазы методом автокорреляционной спектроскопии // *Коллоид. журн.* 1993. Т. 55. С. 10–15.
383. *Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy* / Ed. R. Pecora. N.Y; L.: Plenum press, 1985. 420 p.
384. *Камминс Г., Пайк Э.* Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов. М.: Мир, 1978. 584 с.
385. *Носкин В.А.* Изучение макромолекул и надмолекулярных структур методом квазиупругого рассеяния: Дис. ... д-ра физ.-мат. наук. Л., 1983. 249 с.
386. *Кленин В.И.* Термодинамика систем с гибкоцепными полимерами. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1995. 736 с.
387. *Ринкевичюс Б.С.* Лазерная диагностика потоков. М.: МЭИ, 1990. 221 с.
388. *Тучин В.В.* Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1998. 383 с.
389. *Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П.* Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. 240 с.
390. *Brown R.G.W., Burnett J.G., Mansbridge J., Moir C.I.* Miniature laser light scattering instrumentation for particle size analysis // *Appl. Opt.* 1990. Vol. 29. P. 4159–4169.
391. *Фролов Ю.Г.* Курс коллоидной химии: Поверхностные явления и дисперсионные системы. М.: Химия, 1989. 464 с.
392. *Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А.* Коллоидная химия. М.: Изд-во МГУ, 1982. 348 с.
393. *Духин С.С., Дерягин Б.В.* Электрофорез. М.: Наука, 1976. 328 с.
394. *Churaev N.V.* The DLVO theory in Russian colloid science // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1999. Vol. 83. P. 19–32.
395. *Goddard E.D., Vincent B.* Polymer adsorption and dispersion stability. Wash. (D.C.), 1984. 480 p. (Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.).

396. *Mayer A.B.R., Mark J.E.* Colloidal gold nanoparticles protected by cationic polyelectrolytes // *Pure Appl. Chem.* 1997. Vol. 11. P. 2151–2164.
397. *Hermanson G.T.* Bioconjugate techniques. San Diego: Acad. press, 1996. 785 p.
398. *Shenton W., Davis S.A., Mann S.* Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition // *Adv. Mater.* 1999. Vol. 11. P. 449–452.
399. *Chandler J., Gurmin T., Robinson N.* The place of gold in rapid tests // *IVD Technol.* 2000. N 2. P. 37–49.
400. *Dubois L.H., Nuzzo R.G.* Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1992. Vol. 43. P. 437–467.
401. *Lowe C.R.* Nanobiotechnology: The fabrication and applications of chemical and biological nanostructures // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10. P. 428–434.
402. *Letsinger R.L., Elghanian R., Viswanadham G., Mirkin C.A.* Use of a steroid cyclic disulfide anchor in constructing gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates // *Bioconjugate Chem.* 2000. Vol. 11. P. 289–291.
403. *Li Z., Jin R.S., Mirkin C.A., Letsinger R.L.* Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates // *Nucl. Acids Res.* 2002. Vol. 30. P. 1558–1562.
404. *Walton I.D., Norton S.M., Balasingham A.* et al. Particles for multiplexed analysis in solution: Detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74. P. 2240–2247.
405. *Ghosh S.S., Kao P.M., McCue A.W., Chappelle H.L.* Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes // *Bioconjugate Chem.* 1990. Vol. 1. P. 71–76.
406. *Geoghegan W., Ackerman G.* Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: A new method, theory and application // *J. Histochem. Cytochem.* 1977. Vol. 25. P. 1–12.
407. *Horisberger M., Rosset J., Bauer H.* Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscopy // *Experientia.* 1975. Vol. 31. P. 1147–1151.

408. *Lucocq J.* Selective adsorption: A new method for purification of protein A-gold complexes // *Microsc. Res. Technol.* 1996. Vol. 35. P. 314–319.
409. *Slot J.W., Geuze H.J.* Sizing of protein A-colloidal gold probes for immunoelectron microscopy // *J. Cell Biol.* 1981. Vol. 90. P. 533–536.
410. *Wang B.-L., Scopsi L., Nielsen M.H., Larsson L.-I.* Simplified purification and testing of colloidal gold probes // *Histochemistry.* 1985. Vol. 83. P. 109–115.
411. *Siebrands T., Giersig M., Mulvaney P., Fischer C.H.* Steric exclusion chromatography of nanometer-sized gold particles // *Langmuir.* 1993. Vol. 9. P. 2297–2300.
412. *Stoschek C.M.* Protein assay sensitive at nanogram levels // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 160. P. 301–305.
413. *Valentine R.C., Green N.M.* Electron microscopy of an antibody-hapten complex // *J. Mol. Biol.* 1967. Vol. 27. P. 615–617.
414. *Handbook of surface and colloid chemistry* / Ed. K.S. Birdi. Boca Raton: CRC press, 2002. 864 p.
415. *Fleer G.J., Cohen S.M.A., Scheutjens J.M.H.M.* et al. *Polymers at interfaces*, L.: Chapman and Hall, 1993. 502 p.
416. *Ciesiolka T., Gabius H.-J.* An 8 to 10 fold enhancement in sensitivity for quantitation of proteins by modified application of colloidal gold // *Anal. Biochem.* 1988. Vol. 168. P. 280–283.
417. *Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M.* High-throughput screening using the surface plasmon resonance effect of colloidal gold nanoparticles // *Analyst.* 2001. Vol. 126. P. 1645–1648.
418. *Cosgrove T., Hone J.H.E., Howe A.M., Heenan R.K.* A small angle neutron scattering study of the structure of gelatin at the surface of polystyrene latex particles // *Langmuir.* 1998. Vol. 14. P. 5376–5383.
419. *Vaynberg K.A., Wagner N.J., Sharma R., Martic P.* Structure and extent of adsorbed gelatin on acrylic latex and polystyrene colloidal particles // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. Vol. 205. P. 131–140.
420. *Griffiths P.C., King S.M.* Small-angle neutron scattering studies of adsorbed polymer layers // *Encyclopedia of surface and colloid science* / Ed. A. Hubbard. N.Y.: Dekker, 2002. P. 4700–4717.
421. *Seelenmeyer S., Ballauff M.* Investigation of the adsorption of surfactants on the poly(styrene) latex particles by small-angle X-ray scattering // *Macromol. Symp.* 1999. Vol. 145. P. 9–20.
422. *Martin J.M.C., Pâques M., van der Velden-de Groot T. A. M., Beuvery E.C.* Characterization of antibody labeled colloidal gold particles

- and their applicability in a sol particle immunoassay (SPIA) // J. Immunoassay. 1990. Vol. 11. P. 31–47.
423. Adsorption from solution at the solid/liquid interface / Ed. G.D. Parfitt, C.H. Rochester. N.Y.: Acad. press, 1983. 440 p.
424. *Khlebtsov N.G., Dykman L.A., Krasnov Ya.M., Melnikov A.G.* Extinction of light by aggregated gold particles and aggregated conjugates of gold particles to biospecific macromolecules // Electromagnetic and light scattering by nonspherical particles: Theory and Applications / Ed. F. Obelleiro et al. Vigo: Universidade de Vigo, 1999. P. 43–50.
425. *Dykman L.A., Krasnov Ya.M., Bogatyrev V.A., Khlebtsov N.G.* Quantitative immunoassay method based on extinction spectra of colloidal gold bioconjugates // Proc. SPIE. 2001. Vol. 4241. P. 37–41.
426. *Tan Y, Li Y., Zhu D.* Fabrication of gold nanoparticles using a trithiol (thiocyanuric acid) as the capping agent // Langmuir. 2002. Vol. 18. P. 3392–3395.
427. *Wu Z.C., Wang Y.P.* Electromagnetic scattering for multilayered sphere: Recursive algorithms // Radio Sci. 1991. Vol. 26. P. 1393–1401.
428. *Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм В.Д.* Поверхностные явления в белковых системах. М.: Химия, 1988. 240 с.
429. *Likos C.N., Vaynberg K.A., Löwen H., Wagner N.J.* Colloidal stabilization by adsorbed gelatin // Langmuir. 2000. Vol. 16. P. 4100–4108.
430. *Фикман Б.А.* Микробиологическая рефрактометрия. М.: Медицина, 1967. 279 с.
431. *Иоффе Б.Ф.* Рефрактометрические методы химии. Л.: Химия, 1983. 350 с.
432. *Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Сегал О.Л.* и др. Анализ связывания биспецифических моноклональных антител с иммобилизованными антигенами с помощью оптического сенсора // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1643–1654.
433. *Englebiennne P.* Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes // Analyst. 1998. Vol. 123. P. 1599–1603.
434. *Englebiennne P., Van Hoonacker A., Valsamis J.* Rapid homogeneous immunoassay for human ferritin in the Cobas Mira using colloidal gold as the reporter reagent // Clin. Chem. 2000. Vol. 46. P. 2000–2003.
435. *Glomm W.R.* Functionalized gold nanoparticles for applications in bionanotechnology // J. Dispers. Sci. Technol. 2005. Vol. 26. P. 389–414.

436. Csáki A., Möller R., Fritzsche W. Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics // Expert Rev. Mol. Diagn. 2002. Vol. 2. P. 89–94.
437. Плотников В.К. Генетико-физиологическая детерминация распада мРНК злаков *in vitro* // Успехи соврем. биологии. 2003. Т. 123. С. 98–109.
438. Glynnou K., Ioannou P.C., Christopoulos T.K., Syriopoulou V. Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization // Anal. Chem. 2003. Vol. 75. P. 4155–4160.
439. Wu M., Davidson N. Transmission electron microscopic method for gene mapping on polytene chromosomes by *in situ* hybridization // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1981. Vol. 78. P. 7059–7063.
440. Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А., Краснов Я.М., Мельников А.Г. Поглощение света кластерами коллоидных золотых и серебряных частиц, формирующимися в режимах медленной и быстрой агрегации // Коллоид. журн. 2000. Т. 62. С. 844–859.
441. Sendroiu I.E., Mertens S.F.L., Schiffrin D.J. Plasmon interactions between gold nanoparticles in aqueous solution with controlled spatial separation // Phys. Chem. and Chem. Phys. 2006. Vol. 8. P. 1430–1436.
442. Storhoff J.J., Lazarides A.A., Mucic R.C. et al. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? // J. Amer. Chem. Soc. 2000. Vol. 122. P. 4640–4650.
443. Lazarides A.A., Schatz G.C. DNA-linked metal nanosphere materials: Structural basis for the optical properties // J. Phys. Chem. B. 2000. Vol. 104. P. 460–467.
444. Khlebtsov N.G., Melnikov A.G., Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Optical properties and biomedical applications of nanostructures based on gold and silver bioconjugates // Photopolarimetry in Remote Sensing / Ed. G. Videen et al. Dordrecht: Kluwer, 2004. P. 265–308.
445. Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M., Khlebtsov N.G. Advances in high-throughput screening: Biomolecular interaction monitoring in real-time with colloidal metal nanoparticles // Comb. Chem. High Throughput Screen. 2003. Vol. 6. P. 777–787.
446. Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C. et al. Nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and uses therefor. Pat. 6417340 US, 2002.
447. Park S.Y., Stroud D. Theory of the optical properties of a DNA-modified gold nanoparticle system // Physica B. 2003. Vol. 338. P. 353–356.

448. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия: В 3 т.: Пер. с англ. М: Мир, 1985. 1364 с.
449. Zarudnaya M.I., Kolomiets I.M., Potyahaylo A.L., Hovorun D.M. Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: Primary, secondary and higher-order structures // Nucl. Acids Res. 2003. Vol. 31. P. 1375–1386.
450. Hansma H.G., Revenko I., Kim K., Laney D.E. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids // Ibid. 1996. Vol. 24. P. 713–720.
451. Demers L.M., Mirkin C.A., Mucic R.C. et al. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 5535–5541.
452. Sato K., Hosokawa K., Maeda M. Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization // J. Amer. Chem. Soc. 2003. Vol. 125. P. 8102–8103.
453. Petrovykh D.Y., Kimura-Suda H., Whitman L.J., Tarlov M.J. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold // Ibid. 2003. Vol. 125. P. 5219–5226.
454. Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н. и др. Оптические свойства конъюгатов коллоидного золота с олиготимидином и их изменение при реакции гибридизации с полиадениловой кислотой // Коллоид. журн. 2005. Т. 67. С. 458–468.
455. Sumaoka J., Pan F., Nonaka A. et al. Direct attachment of double-stranded DNA to gold surface for preparation of nano-structured devices // Chem. Lett. 2004. Vol. 33. P. 700–701.
456. Walther P., Ariano B.H., Kriz S.R., Müller M. High resolution SEM detection of protein-A gold (15 nm) marked surface antigens using backscattered electrons // Beitr. Elektronenmikrosk. Direktabb. Oberfl. 1983. Bd. 16. S. 539–545.
457. Walther P., Müller M. Detection of small (5–15 nm) gold-labeled surface antigens using backscattered electrons // The science of biological specimen preparation / Ed. M. Müller et al. Chicago: SEM: AMF O'Hare, 1986. P. 195–201.
458. Nagatani T., Saito S., Sato M., Yamada M. Development of an ultrahigh resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system // Scanning Microsc. 1987. Vol. 1. P. 901–909.
459. Erlandsen S.L., Frethem C., Aufrata R. Workshop on high-resolution immunocytochemistry of cell surfaces using field emission SEM // J.

Histochem. Cytochem. 1990. Vol. 38. P. 1779–1780.

460. Müller M., Hermann R. Towards high resolution SEM of biological objects // Proc. of the XII Intern. Congr. of electron microscopy / Ed. L.D. Peachy, D.B. Williams. San Francisco: San Francisco press, 1990. Vol. 3. P. 4–5.

461. Hermann R., Schwarz H., Müller M. High precision immunoscanning electron microscopy using Fab fragments coupled to ultra-small colloidal gold // J. Struct. Biol. 1991. Vol. 107. P. 38–47.

462. Pawley J.B. LVSEM for high resolution topographic and density contrast imaging // Adv. Electronics and Electron. Phys. 1992. Vol. 83. P. 203–274.

463. Dong Y., Shannon C. Heterogeneous immunosensing using antigen and antibody monolayers on gold surfaces with electrochemical and scanning probe detection // Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 2371–2376.

464. Novák L., Deckmyn H., Damjanovich S., Hársfalvi J. Shear-dependent morphology of von Willebrand factor bound to immobilized collagen // Blood. 2002. Vol. 99. P. 2070–2076.

465. Touhami A., Hoffmann B., Vasella A. et al. Probing specific lectin-carbohydrate interactions using atomic force microscopy imaging and force measurements // Langmuir. 2003. Vol. 19. P. 1745–1751.

466. Darbre A. Practical protein chemistry: A handbook. Chichester: Wiley, 1986. 620 p.

467. Vale R.D. The molecular motor toolbox for intracellular transport // Cell. 2003. Vol. 112. P. 467–480.

468. Catt K.J., Tregear G.W. Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes // Science. 1967. Vol. 158. P. 1570–1571.

469. Михайлов А.Т., Сумирский В.Н. Методы иммунохимического анализа в биологии развития. М.: Наука, 1991. 228 с.

470. Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G // J. Immunochem. 1971. Vol. 8. P. 871–874.

471. Chessum B.S., Denmark J.R. Inconstant ELISA // Lancet. 1978. Vol. 1. P. 161.

472. Kricka L.J., Carter T.J.N., Burt S.M. et al. Variability in the adsorption properties of microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay // Clin. Chem. 1980. Vol. 26. P. 741–744.

473. Hawkes R., Niday E., Gordon J. A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies // Anal. Biochem. 1982. Vol. 119. P. 142–147.

474. *Furuya T., Ikemoto K., Kawauchi S. et al.* A novel technology allowing immunohistochemical staining of a tissue section with 50 different antibodies in a single experiment // *J. Histochem. Cytochem.* 2004. Vol. 52. P. 205–210.
475. *Tsang V.C.W., Peralta J.M., Simons A.R.* Enzyme-linked immuno-electrotransfer blot techniques (ELISA) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis // *Meth. Enzymol.* 1983. Vol. 92. P. 377–391.
476. *Towbin H., Gordon J.* Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook // *J. Immunol. Meth.* 1984. Vol. 72. P. 313–340.
477. *Walton B.C., Pappas M.G., Sierra M. et al.* Field use of the Dot-ELISA test for human visceral leishmaniasis in Honduras // *Bull. P.A.H.O.* 1986. Vol. 20. P. 147–155.
478. *Giannini S.H.* Induction and detection of leishmanial infections in *Rattus norvegicus* // *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* 1985. Vol. 79. P. 458–461.
479. *Pappas M.G., Hajkowski R., Hockmeyer W.T.* Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): A micro method for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis // *J. Immunol. Meth.* 1983. Vol. 64. P. 205–214.
480. *Pappas M.G., Hajkowski R., Cannon L.T., Hockmeyer W.T.* Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): Comparison with standard ELISA and complement fixation assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis // *Vet. Parasitol.* 1984. Vol. 14. P. 239–249.
481. *Pappas M.T., Ballou W.R., Gray M.R. et al.* Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific Dot-ELISA: Comparison with the microscopic agglutination test // *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1985. Vol. 34. P. 346–354.
482. *Hahn G., Bransch B.* Universal immuno-stick test for direct rapid identification of microbial antigens within 5 minutes // *Zbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg.* 1988. Bd. 267. S. 519–527.
483. *Meier-Dieter U., Acker G., Mayer H.* Detection of enterobacterial common antigen on bacterial cell surfaces by colony-immunoblotting: Effect of its linkage to lipopolysaccharide // *FEMS Microbiol. Lett.* 1989. Vol. 59. P. 215–220.
484. *Падюков Л.Н., Семенов Б.Ф.* Перспективы развития средств иммунохимической диагностики бактериальных инфекций // *ЖВХО.* 1989. Т. 34. С. 11–17.

485. Карулин А.Ю., Дзантиев Б.Б., Орлова Г.Г., Егоров А.М. Некоторые закономерности иммуноферментного анализа бактериальных клеток // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 9. С. 12–18.
486. Карулин А.Ю., Дзантиев Б.Б. Поливалентное взаимодействие АГ–АТ: Теоретические модели и роль в иммуноанализе клеток // ЖВХО. 1989. Т. 34. С. 30–37.
487. Valle M., Munoz M., Kremer L. et al. Selection of antibody probes to correlate protein sequence domains with their structural distribution // Protein Sci. 1999. Vol. 8. P. 883–889.
488. Larsson L.-I. A novel immunocytochemical model system for specificity and sensitivity screening of antisera against multiple antigens // J. Histochem. Cytochem. 1981. Vol. 29. P. 408–410.
489. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 4350–4354.
490. Мудлер М. Введение в мембранную технологию. М.: Мир, 1999. 513 с.
491. Стародуб Н.Ф., Артюх В.П., Назаренко В.И., Коломиец Л.И. Белковый иммуноблот и иммунодот в биохимических исследованиях // Укр. биохим. журн. 1987. Т. 59. С. 108–120.
492. Vaessen R.T.M.J., Kreike J., Groot G.S.P. Protein transfer to nitrocellulose filters // FEBS Lett. 1981. Vol. 124. P. 193–196.
493. Gourlet P., Svoboda M., Cauvin A., Christophe J. The sensitivity of dot immunoassay for the peptides helodermin, PHI and PHM increases after peptide cross-linking to proteins prefixed on nitrocellulose // J. Immunol. Meth. 1990. Vol. 133. P. 151–157.
494. Добриков М.И., Тенетова Е.Д., Шиликин Г.В. Ковалентная иммобилизация белков на светочувствительных капроновых мембранах для твердофазного иммуноанализа // Биотехнология. 1991. № 1. С. 80–84.
495. Bowen B., Steinberg J., Laemmli U.K., Wientraub H. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting // Nucl. Acids. Res. 1980. Vol. 8. P. 1–20.
496. Gershoni J.M., Palade G.E. Protein blotting: Principles and applications // Anal. Biochem. 1983. Vol. 131. P. 1–15.
497. Nonradioactive labeling and detection of biomolecules / Ed. C. Kessler. B.: Springer, 1992. 436 p.

498. *Wirth P.J., Romano A.* Staining methods in gel electrophoresis, including the use of multiple detection methods // *J. Chromatogr. A.* 1995. Vol. 698. P. 123–143.
499. *Dunn M.J.* Detection of proteins on blots using the avidin-biotin systems // *Meth. Mol. Biol.* 1994. Vol. 32. P. 227–232.
500. *Härtig W., Kirazov L., Brückner G.* et al. Blot analyses and immunocytochemistry of neural antigens with digoxigenylated primary and secondary antibodies // *Brain Res. Protocols.* 1997. Vol. 2. P. 35–43.
501. *Burnette W.N.* "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A // *Anal. Biochem.* 1981. Vol. 112. P. 195–203.
502. *Southern E.M.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 98. P. 503–517.
503. *Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R.* Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1977. Vol. 74. P. 5350–5354.
504. *Kurien B.T., Scofield R.H.* Protein blotting: A review // *J. Immunol. Meth.* 2003. Vol. 274. P. 1–15.
505. *Glass W.F., Briggs R.C., Hnilica L.S.* Identification of tissue-specific nuclear antigens transferred to nitrocellulose // *Science.* 1981. Vol. 211. P. 70–72.
506. *Bell M.L., Engvall E.* The specific detection of collagenous proteins after electrophoresis using enzyme-conjugated collagen-binding fibronectin fragments // *Anal. Biochem.* 1982. Vol. 123. P. 329–335.
507. *Jahn L., Schiebler B., Greengard P.* A quantitative dot-immunobinding assay for proteins using nitrocellulose membrane filters // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 1684–1687.
508. *Brada D., Roth J.* "Golden blot"-detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold complexes // *Anal. Biochem.* 1984. Vol. 142. P. 79–83.
509. *Moeremans M., Daneels G., Van Dijck A.* et al. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining // *J. Immunol. Meth.* 1984. Vol. 74. P. 353–360.
510. *Surek B., Latzko E.* Visualization of antigenic proteins blotted onto nitrocellulose using the immuni-gold-staining (IGS)-method // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol. 121. P. 284–289.

511. *Hsu Y.-H.* Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper // *Anal. Biochem.* 1984. Vol. 142. P. 221–225.
512. *Moeremans M., Daneels G., De Raeymaeker M., De Mey J.* Colloidal metal staining of blots // *Handbook of immunoblotting of proteins* / Ed. O.J. Bjerrum, N.H.H. Heegaard. Orlando: CRC press, 1988. Vol. 1. P. 137–144.
513. *Rohringer R.* Detection of proteins with colloidal gold // *Colloidal gold: Principles, methods and applications* / Ed. M.A. Hayat. San Diego: Acad. press, 1989. Vol. 1. P. 396–410.
514. *Fowler S.J.* The detection of proteins on blots using gold or immunogold: Review // *Meth. Mol. Biol.* 1994. Vol. 32. P. 239–255.
515. *Moeremans M., Daneels G., De Mey J.* Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes // *Anal. Biochem.* 1985. Vol. 145. P. 315–321.
516. *Daneels G., Moeremans M., De Raeymaeker M., De Mey J.* Sequential immunostaining (gold/silver) and complete protein staining (AuroDye) on western blots // *J. Immunol. Meth.* 1986. Vol. 89. P. 89–91.
517. *Egger D., Bienz K.* Colloidal gold staining and immunoprobng of proteins on the same nitrocellulose blot // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 166. P. 413–417.
518. *Schapira A.H.V., Keir G.* Two-dimensional protein mapping by gold stain and immunoblotting // *Ibid.* 1988. Vol. 169. P. 167–171.
519. *Jamaguchi K., Asakawa H.* Preparation of colloidal gold for staining proteins electrotransferred onto nitrocellulose membranes // *Ibid.* 1988. Vol. 172. P. 104–107.
520. *Egger D., Bienz K.* Protein (western) blotting // *Mol. Biotechnol.* 1994. Vol. 1. P. 289–305.
521. *Li K.W., Geraerts W.P., Van Elk R., Joosse J.* Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: Comparison of the AuroDye, FerriDye, and India ink staining methods // *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 182. P. 44–47.
522. *Cheley S., Bayley H.* Assaying nanogram amounts of dilute protein // *BioTechniques.* 1991. Vol. 10. P. 730–732.
523. *Casero P., Del Campo G.B., Righetti P.G.* Negative aurodye for polyacrylamide gels: The impossible stain // *Electrophoresis.* 1985. Vol. 6. P. 367–372.
524. *Saman E.* A simple and sensitive method for detection of nucleic acids fixed on nylon-based filters // *Gene Anal. Technol.* 1986. Vol. 3. P. 1–7.

525. Jones G.L., Bailey J.A., O'Connell R.J. Sensitive staining of fungal extracellular matrices using colloidal gold // Mycol. Res. 1995. Vol. 99. P. 567-573.
526. Juurlink B.H., Devon R.M. Colloidal gold as a permanent marker of cells // Experientia. 1991. Vol. 47. P. 75-77.
527. Poulain D., Ayadi A., Fruit J. Détection d'un antigène témoin d'infection systémique à *Candida* à l'aide d'un anticorps monoclonal couplé à l'or colloïdal // Ann. biol. clin. 1987. Vol. 45. P. 565-572.
528. Kimball S.R., Rannels S.L., Elenski M.B., Jefferson L.S. Quantitation of proteins by dot-immunobinding assay: A comparison of visualization methods using eukaryotic initiation factor 2 and a monospecific antibody // J. Immunol. Meth. 1988. Vol. 106. P. 217-223.
529. Великов В.А., Ермошина О.С., Волохина И.В., Чумаков М.И. Получение миниантител к белку вирулентности VirE2 *Agrobacterium tumefaciens* методом фагового дисплея // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2006. № 1. С. 21-24.
530. Seitz J. Karenzin – a hormone dependent secretory protein of the rat seminal vesicle with actin-binding properties // Hoppe-Seyler's Ztschr. biol. Chem. 1987. Bd. 368. S. 442-447.
531. Li W.P., Zuber C., Roth J. Use of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating lectin in histochemical and blotting techniques: A comparison of digoxigenin and biotin labelled lectins // Histochemistry. 1993. Vol. 100. P. 347-356.
532. Nespolo A., Bianchi G., Salmaggi A. et al Immunoblotting techniques with picogram sensitivity in cerebrospinal fluid protein detection // Electrophoresis. 1989. Vol. 10. P. 34-40.
533. Tomlinson S., Luga A., Huguenel E., Dattagupta N. Detection of biotinylated nucleic acid hybrids by antibody-coated gold colloid // Anal. Biochem. 1988. Vol. 171. P. 217-222.
534. Righetti P.G., Casero P., Del Campo G.B. Gold staining in cellulose acetate membranes // Clin. chim. acta. 1986. Vol. 157. P. 167-171.
535. Poor M.L., Santa P.F., Sittampalam G.S. Visualization of multiple protein bands on the same nitrocellulose membrane by double immunoblotting // Anal. Biochem. 1988. Vol. 175. P. 191-195.
536. Steffen W., Linck R.W. Multiple immunoblot: A sensitive technique to stain proteins and detect multiple antigens on a single two-dimensional replica // Electrophoresis. 1989. Vol. 10. P. 714-718.
537. Makkouk K.M., Comeau A. Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue-blot immunoassay and

- its use for virus detection in cereals inoculated at different growth-stages // *Europ. J. Plant Pathol.* 1994. Vol. 100. P. 71–80.
538. *Raoult D., Dasch G.A.* The line blot: An immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of gram-negative bacteria // *J. Immunol. Meth.* 1989. Vol. 125. P. 57–65.
539. *Petchelai B., Hiranras S., Potha U.* Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis // *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1991. Vol. 45. P. 672–675.
540. *Scott J.M., Shreffler W.G., Ghalib H.W. et al.* A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis // *Ibid.* 1991. Vol. 44. P. 272–277.
541. *Liu Y.S., Du W.P., Wu Z.X.* Dot-immunogold-silver staining in the diagnosis of cysticercosis // *Intern. J. Parasitol.* 1996. Vol. 26. P. 127–129.
542. *Liu Y.S., Du W.P., Wu Y.M. et al.* Application of dot-immunogold-silver staining in the diagnosis of clonorchiasis // *J. Trop. Med. Hyg.* 1995. Vol. 98. P. 151–154.
543. *Chu F., Ji Q., Yan R.-M.* Study on using colloidal gold immuno-dot assay to detect special antibody of hemorrhagic fever renal syndrome // *Chin. J. Integrated Traditional and Western med.* 2001. Vol. 21. P. 504–506.
544. *Dar V.S., Ghosh S., Broor S.* Rapid detection of rotavirus by using colloidal gold particles labeled with monoclonal antibody // *J. Virol. Meth.* 1994. Vol. 47. P. 51–58.
545. *Fernandez D., Valle I., Llamas R. et al.* Rapid detection of rotavirus in feces using a dipstick system with monoclonal-antibodies and colloidal gold as marker // *Ibid.* 1994. Vol. 48. P. 315–323.
546. *Yee J.L., Jennings M.B., Carlson J.R., Lerche N.W.* A simple, rapid immunoassay for the detection of simian immunodeficiency virus antibodies // *Lab. Anim. Sci.* 1991. Vol. 41. P. 119–122.
547. *Reboli A.C.* Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for candida antigen-detection // *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31. P. 518–523.
548. *Poulain D., Mackenzie D.W., Van Cutsem J.* Monoclonal antibody-gold silver staining dot assay for the detection of antigenaemia in candidosis // *Mycoses.* 1991. Vol. 34. P. 221–226.
549. *Vera-Cabrera L., Rendon A., Diaz-Rodriguez M. et al.* Dot blot assay for detection of antidiacyltrehalose antibodies in tuberculous patients // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. Vol. 6. P. 686–689.

550. *Kunakorn M., Petchclai B., Khupulsup K., Naigowit P.* Gold blot for detection of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-specific antibodies for rapid serodiagnosis of melioidosis // *J. Clin. Microbiol.* 1991. Vol. 29. P. 2065–2067.
551. *Huang Q., Lan X., Tong T. et al.* Dot-immunogold filtration assay as a screening test for syphilis // *Ibid.* 1996. Vol. 34. P. 2011–2013.
552. *Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., Голубинский Е.П.* Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного золота, для обнаружения антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1998. № 6. С. 64–69.
553. *Лазарчук В.А., Титов Л.П., Воробьева Т.Н. и др.* Тест-система на основе конъюгатов антибактериальных антител с коллоидным золотом для выявления антигенов шигелл в биологических жидкостях // *Изв. НАН Белоруссии. Сер. мед. наук.* 2005. № 3. С. 44–47.
554. *Xu Z.* Immunogold dot assay for diagnosis of early pregnancy // *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei).* 1992. Vol. 72. P. 216–218.
555. *Matsuzawa S., Kimura H., Itoh Y. et al.* A rapid dot-blot method for species identification of bloodstains // *J. Forensic Sci.* 1993. Vol. 38. P. 448–454.
556. *Cremers A.F., Jansen in de Wal N., Wiegant J. et al.* Non-radioactive *in situ* hybridization: A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy // *Histochemistry.* 1987. Vol. 86. P. 609–615.
557. *Walker A.G., Dawe K.I.* The rapid and sensitive enumeration of antibody-secreting cells using immunogold/silver staining (SIG-blot assay) // *J. Immunol. Meth.* 1987. Vol. 104. P. 281–283.
558. *Smithwick E.B., Young L.G.* Solid-phase indirect immunogold localization of human sperm antigens reacting with antisperm antibodies in human sera // *J. Androl.* 1990. Vol. 11. P. 246–254.
559. *Hatakeyama T., Murakami K., Miyamoto Y., Yamasaki N.* An assay for lectin activity using microtiter plate with chemically immobilized carbohydrates // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 237. P. 188–192.
560. *Vazquez S., Lemos G., Pupo M. et al.* Diagnosis of Dengue virus infection by the visual and simple AuBioDOT immunoglobulin M capture system // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003. Vol. 10. P. 1074–1077.
561. *Kaur R., Raje M.* A solid-phase method for evaluation of gold conjugate used in quantitative detection of antigen by immunogold-labeling electron microscopy // *J. Immunol. Meth.* 2003. Vol. 279. P. 33–40.

562. Duan L., Wang Y., Li S.S. et al. Rapid and simultaneous detection of human hepatitis B virus and hepatitis C virus antibodies based on a protein chip assay using nano-gold immunological amplification and silver staining method // BMC Infect. Diseases. 2005. Vol. 5, N 53. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/53>.
563. Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Перспективы использования коллоидного серебра как маркера в иммуноанализе // Сибирь-Восток. 2002. Вып. 3 (51). С. 10–12.
564. Загоскина Т.Ю., Полтавченко А.Г., Докорина А.А. Обнаружение противобруцеллезных антител в сыворотках крови экспериментальных животных в дот-иммуно-анализе с антигенной фракцией бруцелл, маркированной частицами активированного угля // Там же. 2002. Вып. 8 (56). С. 8–9.
565. Han A., Dufva M., Belleville E., Christensen C.B.V. Detection of analyte binding to microarrays using gold nanoparticle labels and a desktop scanner // Lab. Chip. 2003. Vol. 3. P. 329–332.
566. Peruski A.H., Peruski L.F. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003. Vol. 10. P. 506–513.
567. Long G.W., O'Brien T. Antibody-based systems for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples // J. Appl. Microbiol. 1999. Vol. 87. P. 214.
568. Bird C.B., Miller R.L., Miller B.M. Reveal for *Salmonella* test system // J. AOAC Intern. 1999. Vol. 82. P. 625–633.
569. Wu S.J., Paxton H., Hanson B. et al. Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000. Vol. 7. P. 106–110.
570. Escalante H.A., Huamanchay O.C., Davelois K.A. La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos // Rev. Med. Exp. 2001. Vol. 18. P. 57–62.
571. Engler K.H., Efstratiou A., Norn D. et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: Description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria // J. Clin. Microbiol. 2002. Vol. 40. P. 80–83.
572. Shyu R.H., Shyu H.F., Liu H.W., Tang S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin // Toxicon. 2002. Vol. 40. P. 255–258.
573. Chanteau S., Rahalison L., Ralafiarisoa L. et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague //

Lancet. 2003. Vol. 361. P. 211–216.

574. *Grobusch M.P., Schormann D., Schwenke S. et al.* Rapid immunochromatographic assay for diagnosis of tuberculosis // J. Clin. Microbiol. 1998. Vol. 36. P. 3443.

575. *Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О. и др.* Системы экспрессной иммунодетекции биологически активных соединений // Клин. лаб. диагностика. 2002. № 8. С. 25–32.

576. Millipore's short guide for developing immunochromatographic test strips. Bedford: Millipore corporation, 1999. 42 p.

577. *Cho J.-H., Paek S.-H.* Semiquantitative, bar-code version of immunochromatographic assay system for human serum albumin as model analyte // Biotechnol. Bioeng. 2001. Vol. 75. P. 725–732.

578. *Wang S., Zhang C., Wang J., Zhang Y.* Development of colloidal gold-based flow-through and lateral-flow immunoassays for the rapid detection of the insecticide carbaryl // Anal. chim. acta. 2005. Vol. 546. P. 161–166.

579. *McCarvil J., McKenna A.J., Grief C. et al.* Expression of meningo-coccal epitopes in LamB of *Escherichia coli* and the stimulation of serosubtype-specific antibody responses // Mol. Microbiol. 1993. Vol. 10. P. 203–213.

580. *Liang R., Emerich D.W.* Analysis of lectin binding by *Bradyrhizobium japonicum* strains grown on nitrocellulose filters using peroxidase-labelled lectin // Anal. Biochem. 1987. Vol. 164. P. 488–493.

581. *Achacha M., Mittal K.R.* Rapid identification of porcine *Serpulina* species by colony blot assay using a genus-specific monoclonal antibody // Vet. Rec. 1996. Vol. 139. P. 539–41.

582. *Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И.* Твердофазный иммуноанализ с использованием коллоидного золота в серотипировании азоспирилл // Микробиология. 1991. Т. 60. С. 524–529.

583. *Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartzburg B.I.* The serotyping of *Azospirillum* Spp by cell gold immunoblotting // FEMS Microbiol. Lett. 1992. Vol. 96. P. 115–118.

584. *Van de Plas P.* The dot-spot test: A simple method to monitor immunoreagent reactivity and influence of fixation on antigen recognition // AURION Newslett. 1997. N 4. P. 1-6.

585. *Leamml U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

586. *Hitchcock P.J., Brown J.* Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154. P. 269–277.
587. *Peridas G., Plagens U., Traub P.* Protein transfer from fixed, stained, and dried polyacrylamide gels and immunoblot with protein A-gold // *Anal. Biochem.* 1986. Vol. 152. P. 94–99.
588. *Moeremans M., Daneels G., De Raeymaeker M., De Mey J.* Staining method for protein and nucleic acids. Pat. 0165633 Europe, 1985.
589. *Behnke O., Ammitzboll T., Jessen H.* et al. Non-specific binding of protein-stabilized gold sols as a source of error in immunocytochemistry // *Europ. J. Cell Biol.* 1986. Vol. 41. P. 326–338.
590. *Hunter J.B., Hunter S.M.* Protein assay in the low nanogram range by AuroDye staining // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 164. P. 430–433.
591. *O'Toole D.K.* The toluidine blue-membrane filter method: Absorption spectra of toluidine blue stained bacterial cells and the relationship between absorbance and dry mass of bacteria // *Stain Technol.* 1983. Vol. 58. P. 291–298.
592. *Roach P.D., Zollinger M., Noel S.P.* Detection of the low density lipoprotein (LDL) receptor on nitrocellulose paper with colloidal gold-LDL conjugates // *J. Lipid Res.* 1987. Vol. 28. P. 1515–1521.
593. *Tarlton J.F., Knight P.J.* Comparison of reflectance and transmission densitometry, using document and laser scanners, for quantitation of stained Western blots // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 237. P. 123–128.
594. *Чибисов К.И.* Общая фотография. М.: Искусство, 1984. 446 с.
595. *Картузанский А.Л., Красный-Адмони Л.В.* Химия и физика фотографического процесса. Л.: Химия, 1986. 138 с.
596. *Van Beek L.K.H.* Special properties of physical development process // *J. Photogr. Sci. Eng.* 1976. Vol. 20. P. 88–91.
597. *Danscher G.* Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electron microscopy // *Histochemistry.* 1981. Vol. 71. P. 81–88.
598. *James T.H.* The theory of the photographic process. N.Y.: Macmillan, 1977. 373 p.
599. *Scopsi L.* Silver-enhanced colloidal gold method // *Colloidal gold: Principles, methods and applications* / Ed. M.A. Hayat. San Diego: Acad. press, 1989. Vol. 1. P. 251–295.
600. *Lageman A., Buchheim P.* Die Gold-Silber-Technik – ein neues immunohistochemisches Verfahren zum Nachweis von Zellmembranantigenen // *Acta histochem.* 1985. Bd. 76. S. 113–120.

601. *Noppe M.J.M., Konigs F.J.* Method for depositing metal particles on a marker. Pat. 029394 Europe, 1990.
602. *Skutelsky E., Goyal V., Alroy J.* The use of avidin-gold complex for light microscopic localization of lectin receptors // *Histochemistry*. 1987. Vol. 86. P. 291–295.
603. *Hacker G.W., Polak J.M., Springall D.R.* et al. Immunogold-silver staining (IGSS) – a review // *Mikroskopie (Vienna)*. 1985. Bd. 42. S. 318–325.
604. *Danscher G.* Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy // *Histochemistry*. 1981. Vol. 71. P. 1–16.
605. *Van den Pol A.N.* Silver intensification of colloidal gold or horseradish peroxidase for dual ultrastructural immunocytochemistry // *Molecular neuroanatomy* / Ed. F. van Leeuwen et al. Amsterdam: Elsevier, 1988. P. 315–336.
606. *Bohlool B.B., Schmidt E.* The immunofluorescence approach in microbial ecology // *Advanced in microbial ecology* / Ed. M. Alexander. N.Y.: Acad. press, 1980. P. 203–241.
607. *Schlöter M., Aßmus B., Hartman A.* The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment // *Biotechnol. Adv.* 1995. Vol. 13. P. 75–90.
608. *Kirchhof G., Schlöter M., Aßmus B., Hartman A.* Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes // *Soil Biol. Biochem.* 1997. Vol. 29. P. 853–862.
609. *Levanony H., Bashan Y.* Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining technique // *Curr. Microbiol.* 1989. Vol. 18. P. 145–149.
610. *Маторы Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю.* Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // *Микробиология*. 1998. Т. 67. С. 815–820.
611. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. М.: Наука, 2005. 262 с.
612. *Ramos A., Zavala F., Hoecker G.* Immune response to glutaraldehyde-treated cells. I. Dissociation of immunological memory and antibody production // *Immunology*. 1979. Vol. 36. P. 775–780.
613. *Makinde A.A., Molokwu J.U., Ezech A.O.* Humoral antibody response to glutaraldehyde-treated antigens of *Dermatophilus congolensis* // *Vet.*

Quart. 1986. Vol. 8. P. 145–149.

614. *Matora L.Yu., Solovova G.K., Serebrennikova O.B.* et al. Immunological properties of *Azospirillum* cell surface: The structure of carbohydrate antigens and evaluation of their involvement in bacteria-plant contact interaction // *Azospirillum VI* and related microorganisms: Genetics, physiology / Ed. I. Fendrik. B.: Springer, 1995. P. 377–382.

615. *Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J.* Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* sp. // *Brasil. Biol. Fertil. Soils*. 1987. Vol. 4. P. 37–40.

616. *Schlöter M., Bode W., Hartmann A.* Characterization of monoclonal antibodies against cell surface structures of *Azospirillum brasilense* Sp 7 using ELISA techniques // *Symbiosis*. 1992. Vol. 13. P. 37–45.

617. *De Polli H., Bohlool B.B., Döbereiner J.* Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups // *Arch. Microbiol.* 1980. Vol. 36. P. 217–222.

618. *Матвеев В.Ю., Богатырев В.А., Дыкман Л.А.* и др. Физико-химические свойства клеточной поверхности R- и S-вариантов штамма *Azospirillum brasilense* // *Микробиология*. 1992. Т. 61. С. 645–651.

619. *Матора Л.Ю., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Щеголев С.Ю.* Иммунохимическая идентификация азоспирилл и исследование их антигенных структур // *Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями* / Под ред. В.В. Игнатова. М.: Наука, 2005. С. 209–237.

620. *Тимофеева Г.А., Цинзерлинг А.В.* Острые кишечные инфекции у детей. Л.: Медицина, 1984. 304 с.

621. *Shchyogolev S.Yu., Khlebtsov N.G., Schwartsburd B.I.* Spectroturbidimetry as applied to biomedical and immunological investigations // *Proc. SPIE*. 1993. Vol. 1981. P. 67–87.

622. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А.* Применение дот-анализа и иммунозолотых маркеров для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1999. № 4. С. 93–94.

623. *Dykman L.A., Bogatyrev V.A.* Use of the dot-immunogold assay for the rapid diagnosis of acute enteric infections // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000. Vol. 27. P. 135–137.

624. *Дыкман Л.А., Семенов С.В., Староверов С.А.* и др. Применение метода дот-иммуноанализа и конъюгатов коллоидного золота для идентификации *Y. pseudotuberculosis* // *Материалы VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов: Сб. ст.: В 4 т.* М.: Росинэк, 2002. Т. 3. С. 256–257.

625. Бунин В.Д., Игнатов О.В., Гулий О.И. и др. Исследование электрофизических свойств клеток *Listeria monocytogenes* при взаимодействии с моноклональными антителами // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 316–321.
626. Petrov R.V., Schwartsburd B.I., Bogatyrev V.A. et al. Solid-phase immunoassay with colloidal gold conjugates for diagnosis of HIV-infection // 15th Intern. Congr. biochem. Jerusalem, 1991.
627. Petrov R.V., Khaitov R.M., Sidorovich I.G. et al. The use of synthetic peptides in the diagnosis of HIV-infections // Biomed. Sci. 1990. Vol. 1. P. 239–244.
628. Sumaroka M.V., Dykman L.A., Bogatyrev V.A. et al. Use of the dot-blot immunogold assay to identify a proliferative antigen in the initial cells of a wheat stem meristem // J. Immunoassay. 2000. Vol. 21. P. 401–410.
629. Leuwing J.H.W., Thal P.J.H.M., Van der Waart M., Schuurs A.H.W.M. Sol particle immunoassay (SPIA) // Ibid. 1980. Vol. 1. P. 77–91.
630. Leuwing J.H.W., Thal P.J.H.M., Van der Waart M., Schuurs A.H.W.M. A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin // J. Immunol. Meth. 1981. Vol. 45. P. 183–194.
631. Leuwing J.H.W., Coverde B.C., Thal P.J.H.M., Schuurs A.H.W.M. A homogeneous sol particle immunoassay for human chorionic gonadotrophin using monoclonal antibodies // Ibid. 1983. Vol. 60. P. 9–23.
632. Leuwing J.H.W., Thal P.J.H.M., Schuurs A.H.W.M. Optimization of a sandwich sol particle immunoassay for human chorionic gonadotrophin // Ibid. 1983. Vol. 62. P. 175–184.
633. Gribnau T.J.C., Leuwing J.H.W., Van Hell H. Particle-labelled immunoassays. A review // J. Chromatogr. 1986. Vol. 176. P. 175–179.
634. Van Hell H., Leuwing J.H.W., Gribnau T.J.C. Particle immunoassays // Alternative immunoassays / Ed. W.P. Collins. Chichester: Wiley, 1985. P. 39–58.
635. Deelder A.M., Dozy M.H. Applicability of sol particle immunoassay (SPIA) for detection of *Schistosoma mansoni* circulating antigens // Acta Leiden. 1982. Vol. 48. P. 17–22.
636. Wielaard F., Denissen A., van der Veen L., Rutjes I. A sol-particle immunoassay for determination of anti-rubella antibodies: Development and clinical validation // J. Virol. Meth. 1987. Vol. 17. P. 149–158.
637. Van Erp R., Gribnau T.J.C., Van Sommeren A.P., Bloemers H.P. Application of a sol particle immunoassay to the determination of affinity

- constant of monoclonal antibodies // J. Immunoassay. 1991. Vol. 12. P. 425–443.
638. *Zeisler R., Stone S.F., Viscidi R.P., Cerny E.H.* Sol particle immunoassays using colloidal gold and neutron activation // J. Radioanal. Nucl. Chem. 1993. Vol. 167. P. 445–452.
639. *Gasparyan V.K.* Hen egg immunoglobulin Y in colloidal gold agglutination assay: Comparison with rabbit immunoglobulin G // J. Clin. Lab. Anal. 2005. Vol. 19. P. 124–127.
640. *Tanaka M., Matsuo K., Enomoto M., Mizuno K.* A sol particle homogeneous immunoassay for measuring serum cystatin C // Clin. Biochem. 2004. Vol. 37. P. 27–35.
641. *Thanh N.T.K., Rosenzweig Z.* Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles // Anal. Chem. 2002. Vol. 74. P. 1624–1628.
642. *Sakashita H., Tomita A., Umeda Y. et al.* Homogeneous immunoassay using photothermal beam deflection spectroscopy // Ibid. 1995. Vol. 67. P. 1278–1282.
643. *Thanh N.T.K., Rees J.H., Rosenzweig Z.* Laser-based double beam absorption detection for aggregation immunoassays using gold nanoparticles // Anal. Bioanal. Chem. 2002. Vol. 374. P. 1174–1178.
644. *Zhang C.X., Zhang Y., Wang X. et al.* Hyper-Rayleigh scattering of protein-modified gold nanoparticles // Anal. Biochem. 2003. Vol. 320. P. 136–140.
645. *Benecky M.J., Post D.R., Schmitt S.M., Kochar M.S.* Detection of hepatitis B surface antigen in whole blood by coupled particle light scattering (Copalis) // Clin. Chem. 1997. Vol. 43. P. 1764–1770.
646. *Storhoff J.J., Elghanian R., Mucic R.C. et al.* One-pot colorimetric differentiation of poly-nucleotides with single base imperfections using gold nano-particle probes // J. Amer. Chem. Soc. 1998. Vol. 120. P. 1959–1964.
647. *Mann S., Davis S.A., Hall S.R. et al.* Crystal tectonics: Chemical construction and self-organization beyond the unit cell // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 2000. N 21. P. 3753–3763.
648. *Liu J., Lu Y.* Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles // Angew. Chem. Intern. Ed. 2006. Vol. 45. P. 90–94.
649. *Connolly S., Fitzmaurice D.* Protein-programmed assembly of gold nanocrystals in aqueous solution // Adv. Mater. 1999. Vol. 11. P. 1202–1205.

650. Mann S., Shenton W., Li M. et al. Biologically programmed nanoparticle assembly // *Ibid.* 2000. Vol. 12. P. 147–150.
651. Reynolds A.J., Haines A.H., Russell D.A. Gold glyconanoparticles for mimics and measurement of metal ion-mediated carbohydrate-carbohydrate interactions // *Langmuir*. 2006. Vol. 22. P. 1156–1163.
652. Егоров А.М., Дюков М.М. Структура и механизм действия антител // *ЖВХО*. 1982. Т. 27. С. 381–388.
653. Juarez-Salinas H., Ott G.S. Process for binding IgG to protein A. Pat. 4704366 US, 1987.
654. Stoscheck C.M. Quantitation of protein // *Meth. Enzymol.* 1990. Vol. 182. P. 50–69.
655. Brush M. Array of assays: Standard techniques and new methods provide alternatives for the quantitation of proteins in solution // *Scientist*. 2000. Vol. 14. P. 21–23.
656. Geoghegan W.D., Scillian J.J., Ackerman G.A. Passive gold agglutination. An alternative to passive hemagglutination // *J. Immunol. Meth.* 1980. Vol. 34. P. 11–21.
657. Geoghegan W.D. The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold // *J. Histochem. Cytochem.* 1988. Vol. 36. P. 401–407.
658. Zhou H.S., Aoki S., Honma I. et al. Conformational change of protein cytochrome b-562 adsorbed on colloidal gold particles; absorption band shift // *Chem. Commun.* 1997. N 6. P. 605–606.
659. Zhang F.X., Han L., Israel L.B. et al. Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles // *Analyst*. 2002. Vol. 127. P. 462–465.
660. Nair A.S., Tom R.T., Pradeep T. Detection and extraction of endosulfan by metal nanoparticles // *J. Environ. Monit.* 2003. Vol. 5. P. 363–365.
661. Kim Y., Johnson R.C., Hupp J.T. Gold nanoparticle-based sensing of “spectroscopically silent” heavy metal ions // *Nano Lett.* 2001. Vol. 1. P. 165–167.
662. Lee C.R., Kim S.I., Yoon C.J. et al. Size-dependent adsorption of 1,4-phenylenediisocyanide onto gold nanoparticle surfaces // *J. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 271. P. 41–46.
663. Краснов Я.М. Исследование агрегации наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов с биополимерами: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Саратов, 2003. 20 с.

664. *Berg R.H., Erdos G.W., Gritzali M., Brown R.D.* Enzyme-gold affinity labeling of cellulose // *J. Electron Microsc. Technol.* 1988. Vol. 8. P. 371–379.
665. *Bendayan M.* Ultrastructural localization of nuclei acids by the use of enzyme-gold complexes // *J. Histochem. Cytochem.* 1981. Vol. 29. P. 531–541.
666. *Bendayan M., Benhamou N.* Ultrastructural localization of glucoside residues on tissue sections be applying the enzyme-gold approach // *Ibid.* 1987. Vol. 35. P. 1149–1155.
667. *Cabinflaman A., Jauneau A., Morvan C., Demarty M.* Endopolygalacturonase gold complex – parameters influencing the labeling of pectic acid in the cell-walls of flax hypocotyl // *J. Microsc.* 1993. Vol. 171. P. 117–124.
668. *Crumbliss A.L., Stonehuerner J., Henkens R.W.* et al. The use of inorganic materials to control or maintain immobilized enzyme activity // *New J. Chem.* 1994. Vol. 18. P. 327–339.
669. *Gole A., Dash C., Ramakrishnan V.* et al. Pepsin-gold colloid conjugates: Preparation, characterization, and enzymatic activity // *Langmuir.* 2001. Vol. 17. P. 1674–1679.
670. *Bendayan M.* Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: A new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules // *J. Electron. Microsc. Technol.* 1984. Vol. 1. P. 349–372.
671. *Guarise C., Pasquato L., De Filippis V., Scrimin P.* Gold nanoparticles-based protease assay // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 2006. Vol. 103. P. 3978–3982.
672. *Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G.* A protein assay based on colloidal gold conjugates with trypsin // *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 341. P. 16–21.
673. *Смит А.* Прикладная ИК-спектроскопия. М.: Мир, 1982. 327 с.
674. *Кимстач Т.Б., Пожкратов К.В.* Способы подготовки проб для исследования методом ИК-Фурье спектроскопии. М.: ПККН МЗ РФ, 1997. Методические рекомендации от 14.03.1997, № 1/55-97.
675. *Горелик В.С.* Комбинационное рассеяние света // *Сорос. образов. журн.* 1997. № 6. С. 91–96.
676. *Colaianne S.E.M., Aubard J., Hansen S.H., Nielsen O.F.* Raman spectroscopic studies of some biochemically relevant molecules // *Vibrat. Spectrosc.* 1995. Vol. 9. P. 111–120.
677. *Fleischman M., Hendra P.J., McQuillan A.J.* Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode // *Chem. Phys. Lett.* 1974. Vol. 26.

P. 163–166.

678. *Lyon L.A., Keating C.D., Fox A.P.* et al. Raman spectroscopy // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 341R–361R.
679. *Dovbeshko G.I., Fesenko O.M., Shirshov Yu.M., Chegel V.I.* The enhancement of optical processes near rough surface of metals // *Semiconductor Phys. Quantum Electron. and Optoelectron.* 2004. Vol. 7. P. 411–424.
680. *Набиев И.Р., Ефремов Р.Г., Чуманов Г.Д.* Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к изучению биологических молекул // *Успехи физ. наук.* 1988. Т. 154. С. 459–496.
681. *Campion A., Kambhampati P.* Surface-enhanced Raman scattering // *Chem. Soc. Rev.* 1998. Vol. 27. P. 241–250.
682. *Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I.* et al. Surface-enhanced nonlinear Raman scattering at the single-molecule level // *Chem. Phys.* 1999. Vol. 247. P. 155–162.
683. *Kreimer D.I., Nufert T.H.* Advances in the direct detection of analytes in mixtures using optical spectroscopy as applied to and stimulated by molecular biology and biotechnology // *JMBAB.* 1999. Vol. 1. P. 4–16.
684. *Maroun F., Ozanam F., Chazalviel J.-N., Theiß W.* *In situ* infrared investigation of metals electrodeposited for SEIRAS // *Vibrat. Spectrosc.* 1999. Vol. 19. P. 193–198.
685. *Naumann D., Helm D., Labischinski H.* Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy // *Nature.* 1991. Vol. 351. P. 81–82.
686. *Naumann D., Keller S., Helm D.* et al. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells // *J. Mol. Struct.* 1995. Vol. 347. P. 399–405.
687. *Mantsch H.H., Chapman D.* *Infrared spectroscopy of biomolecules.* N.Y.: Wiley, 1996. 359 p.
688. *Brandenburg K., Seydel U.* Infrared spectroscopy of glycolipids // *Chem. Phys. Lipids.* 1998. Vol. 96. P. 23–40.
689. *Osawa M.* Surface-enhanced infrared absorption // *Topics Appl. Phys.* 2001. Vol. 81. P. 163–187.
690. *Kneipp K., Wang Y., Dasari R.R.* et al. Near-infrared surface-enhanced Raman scattering of trinitrotoluene on colloidal gold and silver // *Spectrochim. acta A.* 1995. Vol. 51. P. 2171–2175.
691. *Emory S.R., Nie S.* Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. P. 2631–2635.

692. *Vo-Dinh T.* Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures // *Trends Anal. Chem.* 1998. Vol. 17. P. 557–582.
693. *Dou X., Jung Y.M., Yamamoto H.* et al. Near-infrared excited surface-enhanced Raman scattering of biological molecules on gold colloid // *Appl. Spectrosc.* 1999. Vol. 53. P. 133–138.
694. *Seelenbinder J.A., Brown C.W., Pivarnik P., Rand A.G.* Colloidal gold filtrates as metal substrates for surface-enhanced infrared absorption spectroscopy // *Anal. Chem.* 1999. Vol. 71. P. 1963–1966.
695. *Kneipp K., Kneipp H., Manoharan R.* et al. Extremely large enhancement factors in surface-enhanced Raman scattering for molecules on colloidal gold clusters // *Appl. Spectrosc.* 1998. Vol. 52. P. 1493–1497.
696. *Aroca R.F., Ross D.J., Domingo C.* Surface-enhanced infrared spectroscopy // *Ibid.* 2004. Vol. 58. P. 324A–338A.
697. *Brown C.W., Li Y., Seelenbinder J.A.* et al. Immunoassays based on surface-enhanced infrared absorption spectroscopy // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 2991–2996.
698. *Grubisha D.S., Lipert R.J., Park H.Y.* et al. Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels // *Ibid.* 2003. Vol. 75. P. 5936–5943.
699. *Dou X., Yamaguchi Y., Yamamoto H.* et al. NIR SERS detection of immune reaction on gold colloid particles without bound/free antigen separation // *J. Raman Spectrosc.* 1998. Vol. 29. P. 739–742.
700. *Ni J., Lipert R.J., Dawson G.B., Porter M.D.* Immunoassay readout method using extrinsic Raman labels adsorbed on immunogold colloids // *Anal. Chem.* 1999. Vol. 71. P. 4903–4908.
701. *Xu S., Ji X., Xu W.* et al. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced Raman scattering // *Analyst.* 2004. Vol. 129. P. 63–68.
702. *Kamnev A.A., Dykman L.A., Tarantilis P.A., Polissiou M.G.* Spectroimmunochemistry using colloidal gold bioconjugates // *Biosci. Rep.* 2002. Vol. 22. P. 541–547.
703. *Wanzenbok H.D., Mizaikoff B., Weissenbacher N., Kellner R.* Multiple internal reflection in surface enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA) and its significance for various analyte groups // *J. Mol. Struct.* 1997. Vol. 410/411. P. 535–538.
704. *Schmitt J., Flemming H.-C.* FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis // *Intern. Biodeterior. Biodegrad.* 1998. Vol. 41. P. 1–11.

705. *Bonnin S., Besson F., Gelhausen M. et al.* A FTIR spectroscopy evidence of the interactions between wheat germ agglutinin and N-acetylglucosamine residues // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 456. P. 361–364.
706. *Naumann D., Schultz Ch., Görne-Tschelnokow U., Hucho F.* Secondary structure and temperature behavior of the acetylcholine receptor by Fourier transform infrared spectroscopy // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32. P. 3162–3168.
707. *Ковалев И.Е., Полевая О.Ю.* Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. М.: Наука, 1985. 304 с.
708. *Иванов В.Т., Вольпина О.М., Андропова Т.М.* Пептидные антигены и адъюванты в синтетических вакцинах // *ЖВХО.* 1988. Т. 33. С. 523–530.
709. *Arnon R., Horwitz R.J.* Synthetic peptides as vaccines // *Curr. Opin. Immunol.* 1992. Vol. 4. P. 449–453.
710. *Ben-Yedidia T., Arnon R.* Design of peptide and polypeptide vaccines // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997. Vol. 8. P. 442–448.
711. *Harris W.J., Cunnigham C.* Antibody therapeutics. B.: Springer, 1995. 150 p.
712. *Marco M.-P., Gee S., Hammock B.D.* Immunochemical techniques for enviromental analysis // *Trends Anal. Chem.* 1995. Vol. 14. P. 415–425.
713. *Сергеев В.А.* Вирусные вакцины. Киев: Урожай, 1993. 369 с.
714. *Stills H.F., Jr.* Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants // *ILAR J.* 2005. Vol. 46. P. 280–293.
715. *McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J.* Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains // *Nature.* 1990. Vol. 348. P. 552–554.
716. *Петров Р.В., Хаитов Р.М.* Вакцины нового поколения на основе синтетических полиионов: История создания, феноменология и механизмы действия, внедрение в практику // *Иммунология.* 1998. № 1. С. 4–11.
717. *Петров Р.В., Кабанов В.А., Хаитов Р.М.* Искусственные антигены и вакцины // *ЖВХО.* 1988. Т. 33. С. 502–521.
718. *Дьяконова В.А., Дамбаева С.В., Голубева Н.М. и др.* Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека

- в условиях *in vitro* // Физиология и патология иммунной системы. 2004. Т. 8. С. 100–115.
719. *Kreuter J.* Nanoparticles as adjuvants for vaccines // *Pharm. Biotechnol.* 1995. Vol. 6. P. 463–472.
720. *Gregoriadis G.* Immunological adjuvants: A role for liposomes // *Immunol. Today.* 1990. Vol. 11. P. 89–97.
721. *Fukasawa M.* Liposome oligomannan-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8+ cytotoxic T-lymphocytes // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 441. P. 353–356.
722. *Morris W.* Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation // *Vaccine.* 1994. Vol. 12. P. 5–11.
723. *Масалова О.В., Шепелев А.В., Атанадзе С.Н. и др.* Иммуностимулирующее действие водорастворимых производных фуллерена – перспективных адъювантов для вакцин нового поколения // Докл. РАН. 1999. Т. 369. С. 411–413.
724. *Андреев С.М., Бабахин А.А., Петрухина А.О. и др.* Иммуногенные и аллергогенные свойства конъюгатов фуллерена с аминокислотами и белком // Там же. 2000. Т. 370. С. 261–264.
725. *Pantarotto D., Partidos C.D., Hoebeke J. et al.* Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses // *Chem. and Biol.* 2003. Vol. 10. P. 961–966.
726. *Shiosaka S., Kiyama H., Wanaka A., Tohyama M.* A new method for producing a specific and high titer antibody against glutamate using colloidal gold as a carrier // *Brain Res.* 1986. Vol. 382. P. 399–403.
727. *Зильбер Л.А., Фризе В.В.* Об антигенных свойствах коллоидных металлов // Журн. эксперим. биологии. 1929. Т. 11. С. 128.
728. *Zozaya J., Clark J.* Active immunization of mice with the polysaccharides of pneumococci types I, II and III // *J. Exp. Med.* 1933. Vol. 57. P. 21–40.
729. *Зильбер Л.А.* Основы иммунологии. М.: Медгиз, 1958. 600 с.
730. *Shiosaka S., Kohno J., Kiyama H. et al.* Antibody specific to low-molecular weight substance and method of producing the same by using colloidal gold metal as carrier. Pat. 0232717 Europe, 1987.
731. *Wanaka A., Shiotani Y., Kiyama H. et al.* Glutamate-like immunoreactive structures in primary sensory neurons in the rat detected by a specific antiserum against glutamate // *Exp. Brain Res.* 1987. Vol. 65. P. 691–694.
732. *Ottersen O.P., Storm-Mathisen J.* Localization of amino acid neurotransmitters by immunocytochemistry // *Trends Neurosci.* 1987. Vol. 10.

P. 250–255.

733. *Tomii A., Masugi F.* Production of anti-platelet-activating factor antibodies by the use of colloidal gold as carrier // *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 1991. Vol. 44. P. 75–80.

734. *Tatsumi N., Terano Y., Hashimoto K.* et al. An anti-platelet activating factor antibody and its effects on platelet aggregation // *Osaka City Med. J.* 1993. Vol. 39. P. 167–174.

735. *Moffett J.R., Espey M.G., Namboodiri M.A.A.* Antibodies to quino-
linic acid and the determination of its cellular-distribution within the rat
immune-system // *Cell Tissue Res.* 1994. Vol. 278. P. 461–469.

736. *Walensky L.D., Gascard P., Fields M.E.* et al. The 13-kD FK506
binding protein, FKBP13, interacts with a novel homologue of the ery-
throcyte membrane cytoskeletal protein 4.1 // *J. Cell Biol.* 1998. Vol. 141.
P. 143–153.

737. *Chen J., Zou F., Wang N.* et al. Production and application of LPA
polyclonal antibody // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000. Vol. 10. P. 1691–
1693.

738. *Feldman A.L., Tamarkin L., Paciotti G.F.* et al. Serum endostatin
levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth
factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer // *Clin.*
Cancer Res. 2000. Vol. 6. P. 4628–4634.

739. *Оленина Л.В., Колесанова Е.Ф., Гervазиев Ю.В. и др.* Полу-
чение антипептидных антител к участкам связывания белка E2 ви-
руса гепатита С с CD81 // *Мед. иммунология.* 2001. Т. 3. С. 231.

740. *Загоскина Т.Ю.* Теоретические и прикладные аспекты констру-
ирования твердофазных иммунохимических тест-систем для диагно-
стики бруцеллеза: Дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2003. 260 с.

741. *Pow D.V., Crook D.K.* Extremely high titre polyclonal antisera
against small neurotransmitter molecules: Rapid production, characteriza-
tion and use in light and electron-microscopic immunocytochemistry //
J. Neurosci. Meth. 1993. Vol. 48. P. 51–63.

742. *Baude A., Nusser Z., Molnár E.* et al. High-resolution immunogold
localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and
non-synaptic sites in rat hippocampus // *Neuroscience.* 1995. Vol. 69.
P. 1031–1055.

743. *Pickard L., Noël J., Henley J.M.* et al. Developmental changes in
synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor
subunit composition in living hippocampal neurons // *J. Neurosci.* 2000.
Vol. 20. P. 7922–7931.

744. *Holmseth S., Dehnes Y., Bjornsen L.P.* et al. Specificity of antibodies: Unexpected cross-reactivity of antibodies directed against the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) // *Neuroscience*. 2005. Vol. 136. P. 649–660.
745. *Harris D.P., Vordermeier H.-M., Arya A.* et al. Immunogenicity of peptides for B cells is not impaired by overlapping T-cell epitope topology // *Immunology*. 1996. Vol. 88. P. 348–354.
746. *Schäfer M.K.-H., Varoqui H., Defamie N.* et al. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 50734–50748.
747. *Schell M.J., Molliver M.E., Snyder S.H.* D-serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1995. Vol. 92. P. 3948–3952.
748. *Schell M.J., Cooper O.B., Snyder S.H.* D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles // *Ibid.* 1997. Vol. 94. P. 2013–2018.
749. *Eliasson M.J.L., Blackshaw S., Schell M.J., Snyder S.H.* Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: Prominent functional localizations in the brain // *Ibid.* 1997. Vol. 94. P. 3396–3401.
750. *Staimer N., Gee S.J., Hammock B.D.* Development of a sensitive enzyme immunoassay for the detection of phenil- β -D-thioglucoronide in human urine // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001. Vol. 369. P. 273–279.
751. *Деменев В.А., Щинова М.А., Иванов Л.И.* и др. Совершенствование методических подходов к конструированию вакцины против клещевого энцефалита // *Вопр. вирусологии*. 1996. Т. 41. С. 107–110.
752. *Деменев В.А., Щинова М.А., Иванов Л.И.* и др. Способ получения вакцины против клещевого энцефалита на основе растворимого антигена. Пат. 94016771/13 РФ, 1997.
753. *Kayed R., Head E., Thompson J.L.* et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis // *Science*. 2003. Vol. 300. P. 486–489.
754. *Kowalczyk D.W., Ertl H.C.J.* Immune responses to DNA vaccines // *Cell. Mol. Life Sci.* 1999. Vol. 55. P. 751–770.
755. *Hasan U.A., Abai A.M., Harper D.R.* et al. Nucleic acid immunization: Concepts and techniques associated with third generation vaccines // *J. Immunol. Meth.* 1999. Vol. 229. P. 1–22.
756. *Goia D.V.* Preparation and formation mechanisms of uniform metallic particles in homogeneous solutions // *J. Mater. Chem.* 2004.

Vol. 14. P. 451–458.

757. *Liu M.A., Hillerman M.R., Kurth R.* DNA vaccines: A new era in vaccinology // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995. Vol. 772. P. 1–294.

758. *Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A.* DNA vaccines: Immunology, application, and optimization // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. Vol. 18. P. 927–974.

759. *Cui Z., Mumper R.J.* The effect of co-administration of adjuvants with a nanoparticle-based genetic vaccine delivery system on the resulting immune responses // *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 2003. Vol. 5. P. 11–18.

760. *Zhang L., Widera G., Rabussay D.* Enhancement of the effectiveness of electroporation-augmented cutaneous DNA vaccination by a particulate adjuvant // *Bioelectrochemistry.* 2004. Vol. 63. P. 369–373.

761. *Roy M.J., Wu M.S., Barr L.J.* et al. Induction of antigen-specific CD8⁺ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine // *Vaccine.* 2000. Vol. 19. P. 764–778.

762. *Leutenegger C.M., Boretto F.S., Mislin C.N.* et al. Immunization of cats against feline immunodeficiency virus (FIV) infection by using minimalistic immunogenic defined gene expression vector vaccines expressing FIV gp140 alone or with feline interleukin-12 (IL-12), IL-16, or a CpG motif // *J. Virol.* 2000. Vol. 74. P. 10447–10457.

763. *Chen D., Payne L.G.* Targeting epidermal Langerhans cells by epidermal powder immunization // *Cell Res.* 2002. Vol. 12. P. 97–104.

764. *Chen D., Zuleger C., Chu Q.* et al. Epidermal powder immunization with a recombinant HIV gp120 targets Langerhans cells and induces enhanced immune responses // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2002. Vol. 18. P. 715–722.

765. *Dean H.J., Fuller D., Osorio J.E.* Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis // *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2003. Vol. 26. P. 373–388.

766. *Thomas M., Klibanov A.M.* Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 2003. Vol. 100. P. 9138–9143.

767. *Zhao Z., Wakita T., Yasui K.* Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice // *J. Virol.* 2003. Vol. 77. P. 4248–4260.

768. *Eisler R.* Mammalian sensitivity to elemental gold (Au⁰) // *Biol. Trace Element Res.* 2004. Vol. 100. P. 1–18.

769. Dykman L.A., Matora L.Yu., Bogatyrev V.A. Use of colloidal gold to obtain antibiotin antibodies // J. Microbiol. Meth. 1996. Vol. 24. P. 247–248.
770. Bayer E.A., Wilchek M. The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology // Meth. Biochem. Anal. 1980. Vol. 26. P. 1–45.
771. Leary J.J., Brigati D.C., Ward D.C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualising biotin-labelled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1983. Vol. 80. P. 4045–4049.
772. Бадашкеева А.Г., Кнорре Д.Г. Олиго- и полинуклеотидные зонды: Метод молекулярной гибридизации // Молекулярная биология. 1991. Т. 25. С. 309–324.
773. Müller-Höcker J., Schäfer S., Sendelhofert A., Weis S. The application of a biotin-anti-biotin gold technique providing a significant signal intensification in electron microscopic immunocytochemistry: A comparison with the ultrasmall immunogold silver staining procedure // Histochem. Cell. Biol. 1998. Vol. 109. P. 119–125.
774. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 1990. 239 с.
775. Oberwalder U., Steineck T. Observations of the occurrence of pseudotuberculosis in the European brown hare in Austria // Gibier faune sauvage. 1997. Vol. 14. P. 521–526.
776. Тымченко Н.Ф., Долматов И.Ю., Найдено Т.Х. *Yersinia pseudotuberculosis* в модельной морской экосистеме: (экспериментальное исследование) // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1995. № 5. С. 84–88.
777. Джентемирова К.М. Изменчивость *Yersinia enterocolitica* в процессе роста в популяции // Докл. ВАСХНИЛ. 1989. № 11. С. 46–48.
778. Кузнецов В.Г. Роль местообитаний внеорганизменной популяции возбудителя в эпидемиологии псевдотуберкулеза // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1997. № 5. С. 17–21.
779. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.: Мир, 1987. 472 с.
780. Меньшикова В.В. Клиническая лабораторная аналитика. М.: Медицина, 1999. 346 с.
781. Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щербаков А.А. и др. Получение антител к антигенам *Yersinia pseudotuberculosis* с использованием в

- качестве адъюванта частиц коллоидного золота // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2003. № 3. С. 54–57.
782. Антитела: Методы / Под ред. Д. Кэтти. М.: Мир, 1991. 287 с.
783. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. Иммунология: Практикум. Киев: Вища шк., 1989. 304 с.
784. Вольпина О.М., Титова М.А., Жмак М.Н. и др. Предсказание структуры пептидов, способных индуцировать образование антител у мышей // Биоорг. химия. 2002. Т. 28. С. 387–395.
785. Дыкман Л.А., Сумарока М.В., Староверов С.А. и др. Иммуногенные свойства коллоидного золота // Изв. РАН. Сер. биол. 2004. Т. 31. С. 86–91.
786. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Староверов С.А., Семенов С.В. Адъювант. Пат. 2218937 РФ, 2003.
787. Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Staroverov S.A. et al. The adjuvanticity of gold nanoparticles // Proc. SPIE. 2006. Vol. 6164. P. 38–44.
788. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Зайцева И.С. и др. Использование конъюгатов коллоидного золота для идентификации актинов различного происхождения // Биофизика. 2002. Т. 47. С. 632–640.
789. Костеца Н.В., Ламан А.Г., Шепеляковская А.О. и др. Селекция и характеристика фаговых миниантител к актинам различного происхождения // Биохимия. 2005. Т. 70. С. 1070–1077.
790. Moghimi S.M., Muir I.S., Illum L. et al. Coating particles with a block co-polymer (Pluronic-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum // Biochim. biophys. acta. 1993. Vol. 1179. P. 157–165.
791. Kruth H.S., Chang J., Ifrim I., Zhang W.Y. Characterization of phagocytosis: Endocytosis into macrophage surface-connected compartments // Europ. J. Cell Biol. 1999. Vol. 78. P. 91–99.
792. Vallhov H., Qin J., Johansson S.M. et al. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications // Nano Lett. 2006. Vol. 6. P. 1682–1686.
793. Белки иммунной системы / Под ред. В.Т. Иванова. М.: ИБХ РАН, 1997. 140 с.
794. Persellin R.H., Hess E.V., Ziff M. Effect of a gold salt on the immune response // Arthritis Rheum. 1967. Vol. 10. P. 99–106.
795. Measel J.W. Effect of gold on the immune response of mice // Infect. Immunol. 1975. Vol. 11. P. 350–354.
796. Harth M. Gold and modulation of the immune response // J. Rheumatol. Suppl. Vol. 1979. Vol. 5. P. 7–11.

797. *Lewis A.J., Cottney J., White D.D.* et al. Action of gold salts in some inflammatory and immunological models // *Agents Actions*. 1980. Vol. 10. P. 63–77.
798. *Bajaj S., Ahmad I., Fatima M.* et al. Immunomodulatory activity of a Unani gold preparation used in Indian system of medicine // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1999. Vol. 21. P. 151–161.
799. *Stejskal J., Stejskal V.D.M.* The role of metals in autoimmunity and the link to neuroendocrinology // *Neuroendocrinol. Lett.* 1999. Vol. 20. P. 351–364.
800. *Graham G.* Medicinal chemistry of gold // *Agents Actions Suppl.* 1993. Vol. 44. P. 209–217.
801. *Merchant B.* Gold, the noble metal and the paradoxes of its toxicology // *Biologicals*. 1998. Vol. 26. P. 49–59.
802. *Shukla R., Bansal V., Chaudhary M.* et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview // *Langmuir*. 2005. Vol. 21. P. 10644–10654.
803. *Eisler R.* Biogeochemical, health, and ecotoxicological perspectives on gold and gold mining. Boca Raton: CRC press, 2004. 376 p.
804. *Xu Z.P., Zeng Q.H., Lu G.Q., Yu A.B.* Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery // *Chem. Eng. Sci.* 2006. Vol. 61. P. 1027–1040.
805. *Gu H., Ho P.L., Tong E.* et al. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3. P. 1261–1263.
806. *Joshi H.M., Bhumkar D.R., Joshi K.* et al. Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery // *Langmuir*. 2006. Vol. 22. P. 300–305.
807. *Сергеев Г.Б.* Нанохимия. М.: Изд-во МГУ, 2003. 288 с.

Gold nanoparticles : synthesis, properties, biomedical applications / L.A. Dykman, V.A. Bogatyrev, S.Yu. Shchyogolev, N.G. Khlebtsov ; [Ed. by V.V. Ignatov] ; Inst. of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms. – M. : Nauka, 2008. — 319 p. — ISBN 978-5-02-035892-8.

This book is the first domestic monograph containing modern data on the methods for production of gold nanoparticles, their physico-chemical properties and use in biomedical investigations. The methods for synthesis of gold nanoparticles with various sizes, shapes and structures, and for their functionalization by biomolecules, as well as the methods for optical control of all stages of biomarker obtainment are considered. Modern optical models for the absorption and scattering spectra of gold nanoparticles and their conjugates with biomolecules are described. Particular attention is given to the use of colloidal gold in solid-phase analytical methods and in the single-phase sol particle immunoassay. A separate section is devoted to the use of gold nanoparticles as antigen carriers in immunization.

The book is intended for experts in nanobiotechnology, biochemistry, and immunochemistry, as well as for post- and undergraduate students.

Л.А. ДЫКМАН В.А. БОГАТЫРЕВ
С.Ю. ЩЕГОЛЕВ Н.Г. ХЛЕБЦОВ

ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА,
БИОМЕДИЦИНСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ

ISBN 978-5-02-035892-8



9 785020 358928

НАУКА